



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**LUÍSA ZAIDEN CARVALHO MARTINS DE SÁ**

**Determinação eletroanalítica e espectrofotométrica da atividade antioxidante de fermentados de jabuticaba e vinhos de diferentes procedências.**

**Goiânia  
2013**

**LUÍSA ZAIDEN CARVALHO MARTINS DE SÁ**

**Determinação eletroanalítica e espectrofotométrica da atividade antioxidante de fermentados de jabuticaba e vinhos de diferentes procedências.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre Ciências Farmacêuticas.

**Orientador:** Prof. Dr. Eric de Souza Gil

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ieda Maria S. Torres

**Goiânia**

**2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
GPT/BC/UFG**

S111d Sá, Luísa Zaiden Carvalho Martins de.  
Determinação eletroanalítica e espectrofotométrica da atividade antioxidante de fermentados de jabuticaba e vinhos de diferentes procedências [manuscrito] / Luísa Zaiden Carvalho Martins de Sá. -2013.  
82 f. : il, figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Eric de Souza Gil; Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ieda Maria Sapateiro Torres.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, 2013.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, quadros, tabelas, abreviaturas e siglas.

1. Vinhos - Voltametria. 2. Jabuticaba, fermentado de. I. Título.

CDU: 663.2:543.42

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Goiás**

**BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Aluna: Luísa Zaiden Carvalho Martins de Sá**

---

**Orientador: Prof. Dr. Eric de Souza Gil**

---

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ieda Maria Sapateiro Torres**

---

**Membros:**

**1. Elton Clementino da Silva**

**2. Matheus Lavorenti Rocha**

**3. Eric de Souza Gil**

**Data: 28/03/2013**

**DEDICATÓRIA**

*Aos meus queridos pais e irmã,  
por tudo o que eles são e  
representam em minha vida: tudo.*

## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

Primeiramente à Deus, por todas as bênçãos à mim concedidas.

Ao meu orientador, Professor Dr. Eric de Souza Gil, pelas duas grandes oportunidades que me deu, pela confiança que depositou em mim e por todo apoio na realização deste trabalho.

À minha co-orientadora, Professora Dra. Ieda Maria Sapateiro Torres, pelo apoio na parte inicial do mestrado.

Ao Fernando, por toda ajuda e companheirismo na execução deste trabalho.

À todos os amigos da Halex Istar, que tanto me ajudaram na primeira etapa do meu projeto.

À Fernanda Bellato, por toda ajuda e presteza nestes dois anos de mestrado.

À todos os familiares, que de forma direta ou indireta me incentivaram na vida acadêmica, em especial ao meu querido tio César Martins de Sá, maior exemplo de pesquisador e amor à ciência.

À Cidinha, pelo carinho, cuidado e paciência diários.

Aos meus queridos amigos e amigas, pela amizade, companheirismo, incentivo e pelos bons momentos que passamos junta(o)s.

Aos meus pais e Lívia, pelo apoio em todas as horas e pelo amor incondicional. Obrigada por terem sempre acreditado em mim. Amo vocês!

*One not only drinks wine, one smells it, observes it,  
tastes it, sips it, and one talks about it.  
Edward VII (1841-1910).*

## SUMÁRIO

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Vinhos e fermentados.....	3
2.1.1 Jabuticaba e bebidas fermentadas de jabuticaba.....	6
2.1.2 Produtores de vinhos.....	8
2.2 Antioxidantes.....	12
2.2.1 Compostos fenólicos.....	13
2.2.1.1 Oxidação eletroquímica dos flavonoides.....	17
2.3 Métodos para avaliação da capacidade antioxidante.....	20
2.3.1 Folin-Ciocalteu.....	21
2.3.2 ABTS <sup>+</sup> .....	22
2.3.3 DPPH <sup>•</sup> .....	23
2.3.4 Métodos eletroanalíticos.....	24
2.3.4.1 Voltametria cíclica (CV).....	27
2.3.4.2 Voltametria de Pulso Diferencial (DPV).....	29
2.3.4.3 Voltametria de onda quadrada (SWV).....	30
2.3.5 Justificativa.....	32
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivos específicos.....	34

<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Análises da atividade antioxidante de bebidas de jabuticaba.....</b>	<b>35</b>
4.1.1 Amostras.....	35
4.1.2 Reagentes.....	35
4.1.3 Análises espectrofotométricas.....	36
4.1.3.1 Determinação de fenóis totais.....	36
4.1.3.2 Capacidade antioxidante.....	37
4.1.4 Análises eletroquímicas.....	38
4.1.4.1 Equipamentos e acessórios.....	38
4.1.4.2 Aquisição e apresentação dos dados.....	40
4.2 Análises de vinhos.....	41
4.2.1 Amostras.....	41
4.2.1.1 Preparo das amostras.....	41
4.2.2 Análises espectrofotométricas.....	43
4.2.2.1 Atividade antiradicalar de DPPH.....	43
4.2.3 Análises voltamétricas.....	43
4.2.3.1 Equipamentos e acessórios.....	43
4.2.3.2 Aquisição e apresentação dos dados.....	45
4.2.4 Índice eletroanalítico.....	45
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>5.1 Análises das bebidas de jabuticaba.....</b>	<b>46</b>
5.1.1 Análises espectrofotométricas.....	46
5.1.1.1 Teor de fenóis totais em bebidas de jabuticaba.....	46
5.1.1.2 Atividade antioxidante avaliada pelo método de captura do radical ABTS <sup>•+</sup> .....	47
5.1.2 Análises voltamétricas.....	49
5.1.2.1 Voltametria cíclica (CV).....	49
5.1.2.2 Voltametria de pulso diferencial (DPV).....	51
5.1.2.3 Voltametria de onda quadrada (SWV).....	56
5.2 Vinhos de diferentes origens.....	59
5.2.1 Determinação da capacidade antioxidante por meio do método DPPH e Índice Eletroanalítico.....	59

<b>5.2.2 Índice Eletroanalítico.....</b>	<b>63</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>71</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1– Jabuticaba ( <i>Myrciaria Cauliflora</i> ) A) frutas; B) árvore.....	6
Figura 2– Ranking dos 10 maiores produtores de vinho no mundo.....	9
Figura 3– Estrutura básica dos flavonoides.....	15
Figura 4– Subclasses de flavonoides.....	17
Figura 5– Vias de oxidação eletroquímica para compostos fenólicos.....	18
Figura 6– Variação do potencial aplicado ao eletrodo na voltametria cíclica.....	27
Figura 7– Voltamogramas cíclicos característicos de reação reversível (—) e irreversível (— —).....	29
Figura 8– a) esquema de aplicação dos pulsos a partir do $E_{base}$ ; b) esquema da corrente ( $i$ ) em função do potencial ( $E$ ).....	30
Figura 9– a) esquema de aplicação dos pulsos em forma de escada; b) voltamograma típico.....	31
Figura 10– Fermentados branco e tinto de jabuticaba.....	36
Figura 11– Aparatos e equipamentos usados nas análises eletroanalíticas.....	38
Figura 12– Polimento do eletrodo de carbono vítreo com suspensão de Alumina 3 $\mu$ m.....	39
Figura 13– Nacionalidade dos diferentes vinhos analisados.....	42
Figura 14– a) Pasta de carbono; b) eletrodo de pasta de carbono.....	44
Figura 15– Curva concentração – resposta reagente de Folin-Ciocalteu x ácido gálico.....	47
Figura 16– Relação entre a capacidade antioxidante (análise pelo método ABTS) e o teor de fenóis totais (análise pelo método de Folin-Ciocalteu) das quatro bebidas de jabuticaba.....	48
Figura 17– Relação entre a capacidade antioxidante (análise pelo método ABTS) e o teor de fenóis totais (análise pelo método de Folin-Ciocalteu) das quatro bebidas de jabuticaba.....	48
Figura 18– Voltamogramas obtidos por voltametria cíclica a partir das diferentes bebidas de jabuticaba.....	50

Figura 19–	Voltamogramas obtido por voltametria de pulso diferencial a partir das bebidas de jabuticaba.....	52
Figura 20–	Atividade antioxidante relativa determinada por diferentes métodos.....	54
Figura 21–	Análises sucessivas de fermentado branco.....	55
Figura 22 –	Gráfico 3D pH x $E_{pa}$ gráfico e $E_{pa}$ vs. pH.....	57
Figura 23–	Voltamogramas obtidos por SWV para os fermentados tinto e branco de jabuticaba. ....	58
Figura 24–	Repetibilidade da análise da mesma amostra por diferentes EPC. ....	64
Figura 25–	Voltamogramas médios obtidos por DPV para vinhos tintos e brancos.....	65
Figura 26–	Voltamogramas obtidos por DPV.....	66
Figura 27–	Correlação de Pearson entre os métodos de DPPH e DPV, usados para medir atividade antioxidante dos vinhos.....	67

## ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS

	Pág.
<b>Quadro 1</b> – Parâmetros das análises por voltametria cíclica das amostras de bebida de jabuticaba.....	40
<b>Quadro 2</b> – Parâmetros das análises por voltametria de pulso diferencial das amostras de bebida de jabuticaba.....	40
<b>Quadro 3</b> – Parâmetros das análises por voltametria de onda quadrada das amostras de bebida de jabuticaba.....	40
<b>Quadro 4</b> – Parâmetros das análises por voltametria de pulso diferencial das amostras de vinhos.....	45
	Pág.
<b>Tabela 1</b> – Evolução da produção de vinho no período de 2007-2011.....	10
<b>Tabela 2</b> – Teor de Fenóis Totais (FT) e TEAC das bebidas feitas a partir da jabuticaba.....	47
<b>Tabela 3</b> – Corrente para o pico anódico ( $I_{pa}$ ) obtida em solução tampão fostafo 0,1 M, pH 5,0 com 5% v/v de diferentes bebidas de jabuticaba e vinho tinto.....	52
<b>Tabela 4</b> – $EC_{50}$ e índice eletroanalítico para as diferentes amostras de vinho analisadas.....	60
<b>Tabela 5</b> – $EC_{50}$ médio de diferentes grupos de amostras.....	61
<b>Tabela 6</b> – Capacidade antioxidante de sucos de uva brasileiros.....	62
<b>Tabela 7</b> – $EC_{50}$ e Índice eletroanalítico médio para grupos de amostra.....	69

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
CV	Voltametria cíclica
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DPV	Voltametria de pulso diferencial
EC <sub>50</sub>	Quantidade de vinho (amostra) necessária para produzir 50% de descoloração da solução de DPPH•
ECV	Eletrodo de carbono vítreo
EI	Índice Eletroanalítico
EPC	Eletrodo de pasta de carbono
$E_{pa}$	Potencial de pico
FT	Fenóis totais
GA	Ácido gálico
GAE	Equivalente de ácido gálico
$I_{pa}$	Intensidade de pico
OIV	Organização Internacional do Vinho
SWV	Voltametria de onda quadrada
TE	Equivalente de Trolox
TEAC	Capacidade antioxidante total equivalente ao Trolox

## RESUMO

O consumo de vinhos tem sido associado a benefícios à saúde por conter alto teor de compostos fenólicos, o que os torna uma importante fonte alimentar de antioxidantes. Bebidas fermentadas de jabuticaba, assim como os vinhos, também apresentam alto teor de compostos fenólicos. No presente trabalho, foram utilizados métodos espectrofotométricos clássicos (ABTS, DPPH, Folin-Ciocalteu) bem como métodos inovadores (voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada) para avaliação da atividade antioxidante de vinhos de diferentes origens e de bebidas fermentadas de jabuticaba e de uma aguardente de jabuticaba. Além disso, foi proposto um índice eletroanalítico (EI) que permite a comparação da atividade antioxidante medida pelos métodos eletroanalíticos. Para os fermentados de jabuticaba, foi demonstrado em todos os cinco métodos que todas as três variedades, a tinta, a rosê e a branca, apresentam potencial antioxidante elevado, bastante semelhante ao de um vinho tinto seco, enquanto a aguardente de jabuticaba não apresentou nenhum pico nas análises voltamétricas. Nas análises por DPPH, os vinhos tintos demonstraram possuir cerca de cinco vezes mais capacidade antioxidante que os vinhos brancos; já para EI, a diferença encontrada foi de cerca de duas vezes. Os vinhos rosê, branco, espumantes e fortificados demonstraram EI inferior ao dos vinhos tintos. Foi determinada uma correlação de Pearson de -0,91097 entre o método de DPPH e o EI. O EI proposto permite a comparação entre a quantidade de compostos eletroativos encontrados nas diferentes amostras de vinhos analisadas. Considerando-se a natureza eletroativa que os compostos antioxidantes apresentam, os métodos eletroanalíticos demonstraram ser métodos adequados, simples e rápidos para o estudo de tais compostos. A principal desvantagem encontrada nas análises por esse método foi a forte adsorção dos compostos fenólicos devido ao processo de oxidação que eles sofrem, formando um filme isolante na superfície do eletrodo, fato este contornado pelo uso de eletrodos de pasta de carbono.

Palavras-chave: Vinhos. Fermentado de jabuticaba. DPPH. ABTS. Folin-Ciocalteu. Voltametria.

## ABSTRACT

The consumption of wine has been associated with health promoting properties due to the high content of phenolic compounds, what makes wines an important dietary source of antioxidants. Jabuticaba fermented beverages, as much as wine, have a high content of phenolic compounds. In this study, traditional spectrophotometric methods (ABTS, DPPH, Folin-Ciocalteu) as well as novel methods (Cyclic Voltammetry - CV, Differential Pulse Voltammetry - DPV and Square Wave Voltammetry - SWV) have been used to evaluate the antioxidant activity of wines of different origin a jabuticaba fermented beverages and a jabuticaba brandy. Furthermore, an Electroanalytical Index (EI) has been proposed in order to allow the comparison of the antioxidant activity measured by electroanalytical methods. For the fermented beverages of jabuticaba, it has been demonstrated in the five methods that all three varieties, red, white and rose, have high antioxidant potential, very similar to a red dry wine, while the brandy has not shown any peaks in voltammetric analysis. In the analyzes by DPPH, red wines have shown about five times as much the antioxidant capacity of white wines, while for the EI it is twice as much when compared to white wines. Rose, white and fortified wines have shown lower EI than the red wine. It has been determined a Pearson correlation of -0.91097 between the DPPH method and the EI. The proposed EI allows comparison of the amount of electroactive compounds determined in the various wine samples analyzed. Considering the electroactive nature of the antioxidant compounds, electroanalytical methods have been demonstrated suitable for studying such compounds. Its main disadvantage was the high adsorption process due to the phenolic oxidation on the electrode's surface, creating an isolating film on it. This process has been overcome by the use of carbon paste electrode.

Keywords: Wine. Fermented beverage from jabuticaba. DPPH. ABTS. Folin-Ciocalteu. Voltammometry.

## 1 INTRODUÇÃO

Os vinhos são bebidas muito apreciadas nas mais variadas regiões do mundo e seu consumo propicia diversos benefícios à saúde devido a presença de uma grande quantidade de compostos fenólicos, que são considerados os principais antioxidantes naturais.

Tradicionalmente os vinhos são produzidos na Europa, sendo que França, Itália e Espanha são os principais produtores mundiais. Entretanto, a partir da década de 1980, outros países começaram a se destacar nessa área, dentre eles, Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Argentina, Chile e Uruguai.

Além dos vinhos, bebidas fermentadas feitas a partir da uva, é possível se produzir bebidas fermentadas de outras frutas, dentre elas, a jabuticaba, uma fruta originária do Brasil, encontrada em diversas regiões do país. A produção de bebidas fermentadas de jabuticaba merece destaque, tanto como forma de aproveitamento das frutas quanto de agregação de valor à um agroproduto. Assim como os vinhos, as bebidas fermentadas de jabuticaba também apresentam altos teores de compostos fenólicos e, portanto, atuam no combate aos radicais livres.

Os métodos clássicos para determinação de atividade antioxidante de amostras complexas são os espectrofotométricos, dentre eles o ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), o DDPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e o método de Folin-Ciocalteu. Eles são métodos eficientes para essa determinação e já consagrados pelo uso, mas apresentam algumas limitações.

Os métodos eletroanalíticos, por sua vez, representam uma alternativa para determinação da atividade antioxidante de amostras complexas. Eles são métodos simples, baratos e “limpos”, por consumirem pouca quantidade de reagentes, sendo a maioria deles não tóxicos. A voltametria é uma das técnicas eletroanalíticas que pode ser usadas para a determinação da atividade antioxidante de amostras. Esta técnica estuda os fenômenos que ocorrem na interface entre o eletrodo e solução e se baseia em três parâmetros que ocorrem durante a eletrólise: a corrente elétrica, a voltagem e o tempo. Algumas variações na forma de se aplicar o potencial ao eletrodo determinam variações nas técnicas eletroanalíticas, dentre elas voltametria

cíclica (CV), a voltametria de pulso diferencial (DPV) e a voltametria de onda quadrada (SWV).

No presente trabalho, foi proposto um Índice Eletroanalítico quantitativo, determinado com base no potencial de oxidação e na intensidade dos picos observados, os principais parâmetros voltamétricos. Para a proposição do índice, uma vasta gama de amostras de vinhos ( $n = 52$ ) de diferentes origens foi utilizada com o intuito de se avaliar e comparar o índice obtido para eles e, assim, avaliar a influência de diversos fatores como a região produtora, a variedade e o tipo de uva exercem na atividade antioxidante dos vinhos. Além disso, foi avaliada também a atividade antioxidante de bebidas fermentadas de jabuticaba comparando-a com a dos vinhos tradicionais.

Nessas análises, foram utilizados métodos consagrados para a determinação da atividade antioxidante e também métodos eletroanalíticos, ainda considerados inovadores para esse fim e em amplo desenvolvimento.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Vinhos e fermentados

Os vinhos são definidos pela Organização Internacional do Vinho (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin – OIV) como sendo bebidas fermentadas feitas exclusivamente a partir de uvas frescas, amassadas ou não e com teor de álcool não inferior a 8,5%. As uvas (*Vitis vinifera* L. ssp sativa) são frutas ricas em compostos fenólicos, que podem ser encontrados tanto na casca quanto na polpa e nas sementes (Bail *et al*, 2008).

A produção e o consumo dos vinhos datam de períodos remotos. Os primeiros relatos sobre o vinho são da era neolítica (8.500-4.000 a. C.), quando seu consumo representava uma alternativa ao consumo de água, bebida que apresenta condições propícias ao crescimento de diversos micro-organismos, enquanto o vinho, graças ao seu teor alcoólico, é capaz de inibir em parte o desenvolvimento microbiano. A condição de bebida “segura” foi dada aos vinhos por muitos milênios, sendo que eles foram considerados a bebida principal de tropas do exército romano. Nesta situação, sua forma mais comum de consumo era diluído em água, para que conseguisse tanto matar a sede como também de exercer algum efeito antimicrobiano. O vinho foi, também, o anti-séptico mais potente por muitos séculos, até o desenvolvimento da destilação (Estreicher, 2004).

Outra faceta interessante do vinho é sua forte relação com muitas religiões, sendo associado à divindades, dentre eles os conhecidos Dionísio, da cultura grega e seu correspondente Baco, da cultura romana, além de ser a bebida da Igreja Católica, representando um componente importante das liturgias católicas (Munsie, 2002).

Os vinhos são bebidas muito apreciadas, sendo consumida por diversos povos, nacionalidades e culturas. Além do prazer proporcionado por eles, o consumo de vinhos é também associado a benefícios à saúde. Esta constatação se deu devido a estudos epidemiológicos que observaram que a França apresenta uma baixa taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares quando comparado a

países como Inglaterra e Estados Unidos. A população de todos esses países anteriormente citados apresenta dieta rica em gorduras saturadas, que são consideradas grandes vilãs para os processos de aterosclerose. Além disso, outros fatores de risco importantes para as doenças cardiovasculares, como obesidade e tabagismo são tão altos na França quanto em outros países. Dessa maneira, a redução do risco das doenças cardiovasculares foi, então, associada à ingestão diária de doses moderadas de vinho pelos franceses, o que ficou conhecido como o “Paradoxo Francês” (Renaud; Lorgeril, 1992).

Os benefícios da ingestão de vinhos são associados ao fato deles serem ricos em compostos fenólicos, o que os torna uma importante fonte alimentar de antioxidantes (Makhotkina; Kilmartin, 2012).

A vantagem que os vinhos apresentam como fonte de fenóis, mesmo quando comparado as próprias uvas que os originaram, é o fato destes compostos já se encontrarem solubilizados, facilitando o processo de absorção pelo organismo, enquanto nos vegetais (como nas uvas), além destas substâncias não estarem solubilizadas, elas podem se encontrar fortemente ligadas a outros compostos, dificultando ainda mais o processo de absorção (Alonso *et al*, 2004).

É interessante notar, também, que o perfil de polifenóis apresentados pelos vinhos é diferente daquele apresentado pelas uvas a partir das quais eles foram produzidos visto que, na produção dos vinhos, ocorre tanto um aumento na quantidade desses compostos devido ao processo de extração, quanto uma mudança na composição devido às reações de fermentação (Makhotkina; Kilmartin, 2012).

Além dos benefícios à saúde, a presença de compostos fenólicos no vinho merece destaque, pois eles são determinantes de várias características organolépticas, como a coloração, o aroma, o sabor adstringente e levemente amargo. Os polifenóis também estão relacionados com a preservação dos vinhos e com o processo de envelhecimento deles, sendo que a oxidação dessas substâncias pode levar à perda do sabor e à mudança de coloração dessas bebidas (Franquet-Griell *et al*, 2012, Makhotkina; Kilmartin, 2012; Makhotkina; Kilmartin, 2010).

Os vinhos tintos apresentam teor de compostos fenólicos superior ao dos vinhos brancos, fato explicado tanto pela diferença no teor de compostos fenólicos entre as uvas vermelhas e verde quanto pelo processo produção, que, no caso dos vinhos tintos, inclui o processo de maceração, em que as cascas são utilizadas, enquanto nos vinhos brancos apenas a polpa é usada (Borriello *et al*, 2010).

Dentre os diversos flavonoides e ácidos fenólicos presentes nas uvas, o resveratrol (3,5,40-trihydroxystilbene) merece destaque por estar presente em grandes quantidades. Ele é um composto fenólico de baixo peso molecular, presente em maior quantidade nos vinhos, sendo considerado o principal composto antioxidante deles. Muitos estudos vêm demonstrando que seu consumo é benéfico à saúde. Entretanto, ao contrário de muitos compostos fenólicos, sua ação não se dá pela varredura de radicais livres. Ele é capaz de induzir o organismo a produzir mais antioxidantes endógenos, em um mecanismo conhecido como “upregulation” (Li; Xia; Förstermann, 2012).

Os vinhos são as mais populares bebidas fermentadas, todavia, não são as únicas. É possível que sejam feitas bebidas fermentadas a partir de quaisquer frutos que tenham umidade, açúcares e nutrientes (Martinelli Filho, 1983).

Na literatura, é possível encontrar relatos sobre a produção de bebidas fermentadas feitas de diversas frutas, dentre elas abacaxi (Oliveira *et al*, 2012), banana, mandioca, cereais (Ramos *et al*, 2010; Aloys; Angeline, 2009), camu camu (Maeda; Andrade, 2003), laranja (Corazza; Rodrigues; Nozaki, 2001), acerola (Santana *et al* 2010, Almeida *et al*, 2008), maçã (Souza *et al*, 2011), manga (Silva *et al*, 2011) e jabuticaba (Silva *et al*, 2008).

A Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho no Brasil. Assim como a Organização Internacional do Vinho - OIV, ela também define vinho como sendo uma bebida obtida exclusivamente a partir da uva. Entretanto, é frequente que bebidas fermentadas de outras frutas sejam erroneamente denominadas de vinhos (exemplo: vinho de jabuticaba). A denominação correta, de acordo com o Decreto nº 2.314, de 04 de setembro de 1997 é fermentado (exemplo: fermentado de jabuticaba).

### 2.1.1 Jabuticaba e bebidas fermentadas de jabuticaba

A jabuticaba é uma planta da família Myrtaceae, sendo representada por quatro espécies: *Myrciaria Cauliflora*, *M. jaboticaba* Berg, *M. tenella* Berg, *M. trunciflora* Berg (Morton, 1987). É uma fruta pequena, de formato esférico e casca com coloração que vai do roxo ao preto (Figura 1). Sua polpa tem sabor doce, levemente ácido, sendo consumida fresca (Cavalcanti; Veggi; Meireles, 2011; Veggi; Santos; Meireles, 2011).

**Figura 1:** Jabuticaba (*Myrciaria Cauliflora*) A) frutas; B) árvore.



Fonte: autoria própria.

Nativa do Brasil, a jabuticaba é encontrada em grande parte do país, com destaque para os estados de São Paulo, Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro e, além de ser consumida fresca, também pode ser utilizada para produção de sucos, geleia, licores (Oliveira *et al*, 2012; Duarte *et al*, 2010) e bebidas fermentadas (Silva *et al*, 2008).

A produção desse tipo de derivados é bastante interessante quando se fala da jabuticaba devido ao fato de ela ser perecível em um prazo curto, de três a quatro

dias, em decorrência de processos fermentativos naturais que ocorrem mesmo em temperatura ambiente (Reynertson *et al*, 2006; Morton, 1987).

Extratos de jabuticaba demonstram boa atividade de varredura de elétrons no método de DPPH e foram identificados neles compostos fenólicos como antocianinas, quercetina, rutina, miricitrina, ácido cinâmico, ácido cumárico, ácido gálico, ácido elágico e depsídeos (Reynertson *et al*, 2006), um indicativo da potencial capacidade antioxidante que essas frutas, bem como seus derivados, podem apresentar. A grande quantidade de antocianinas que a jabuticaba apresenta pode ser facilmente observada até mesmo visualmente, devido a sua coloração escura. Ela, assim como seus derivados, representa uma importante fonte desses flavonoides (Santos; Veggi; Meireles, 2010; Santos; Meireles, 2009).

Outro composto fenólico presente em grandes quantidades na jabuticaba, principalmente na casca, são os taninos, substâncias conhecidas pela capacidade cicatrizante e de precipitação de proteínas (Adamczyk *et al*, 2011; Vasconcelosa *et al*, 2010; Morton, 1987).

A composição de bebidas fermentadas de jabuticaba é semelhante à dos tradicionais vinhos de uva, demonstrando o potencial deles como bebida fermentada, inclusive como fonte de compostos antioxidantes (Duarte *et al*, 2010).

As bebidas fermentadas produzidas a partir de fontes variadas normalmente apresentam sabor e cheiro que remetem ao da fruta a partir da qual foram produzidos e, quando se investe na qualidade da produção, é possível que sejam produzidas bebidas com características organolépticas peculiares e que agradam aos consumidores. Outrossim, a produção de bebidas fermentadas representa uma forma de melhorar o aproveitamento de frutos visto que, quando produzidos de maneira adequada, apresentam uma longa durabilidade. Além disso, a produção de fermentados merece destaque como uma fonte alternativa de emprego e renda para pequenos trabalhadores rurais (Fortes *et al*, 2011; Silva *et al*, 2011; Souza *et al*, 2011; Santana *et al*, 2010; Asquieri; Silva; Cândido, 2009; Silva *et al*, 2008).

### 2.1.2 Produtores de vinhos

Existem no mundo diversas regiões produtoras de vinhos, sendo que na Europa estão localizados os mais tradicionais países produtores. A França, a Itália e a Espanha representaram, até a década de 1980, os principais produtores no mundo, entretanto, a partir desta década, o cenário mundial da produção e exportação de vinhos vem sofrendo profundas mudanças (Cusmano; Morrison; Rabellotti, 2009; Anderson; Norman; Wittwer, 2001).

Países que não apresentavam qualquer destaque na produção de vinhos estão conquistando parte do espaço antes monopolizado pelos países europeus. Investimentos em novas tecnologias para a produção de vinhos, bem como a realização de parcerias entre empresas e universidades propiciaram uma melhoria significativa na qualidade dos vinhos produzidos por países como África do Sul, Austrália, Argentina, Chile, EUA, Nova Zelândia e Uruguai e, com isso, eles vêm conquistando crescente participação no mercado vinícola (Giuliani *et al*, 2010; Aylward, 2003).

A falta de tradição na produção de vinhos, ao contrário de um empecilho, vem sendo apontada com um trampolim para a qualidade das bebidas produzidas pelos “novos produtores” de vinhos, visto que, exatamente por não terem tradição, eles são mais abertos à adoção de novas tecnologias que tornam a produção dos vinhos mais flexível e que permitem a manufatura de bebidas de qualidade, com maior uniformidade dentro da marca e a preços mais atrativos aos consumidores (Aylward, 2003).

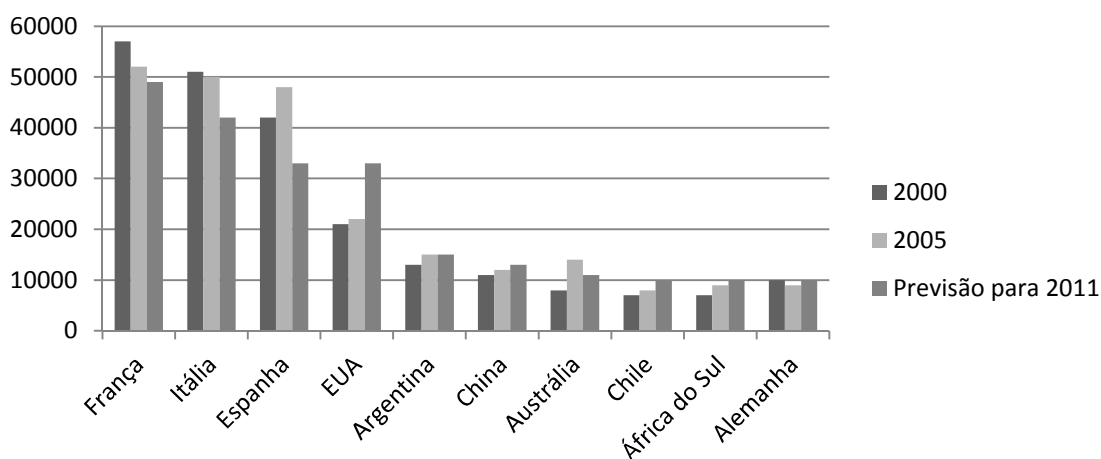
Nos Estados Unidos, o estado da Califórnia representa o maior produtor de vinho, respondendo por 90% da produção. Em nível mundial, os EUA representam o quarto maior produtor, ficando atrás apenas da França, Itália e Espanha (Figura 2) e, dentro dos EUA, ela chega a ser responsável por 61% do mercado de vinho (OIV, 2012; AVF, 2011; Wine Institute, 2011).

A Califórnia despontou como produtora de vinhos a partir da década de 1960 e sua significativa liderança dentre os “novos produtores” certamente é determinada

pelo massivo investimento em pesquisa e desenvolvimento nas indústrias de vinhos e uvas (AVF, 2011; Aylward, 2003).

A África do Sul, país cujas primeiras produções ligadas a vitivinicultura datam de 1652, segundo a OIV, representa o nono maior produtor mundial de vinhos (Figura 2). O governo sul africano fomenta a produção de vinho através de uma agência, a South African Wine Industry Trust (SAWIT), que tem o intuito de promover os produtos fora do país, bem como fazer investimentos no desenvolvimento e qualidade (SAWIT, 2012).

**Figura 2:** Ranking dos 10 maiores produtores de vinho no mundo.



Fonte: Adaptado de: Statistiques du Secteur Vitivinicole Mondial. Organização internacional do vinho – OIV.

A Austrália, por sua vez, concentra vários esforços no intuito de promover a pesquisa, o desenvolvimento, a extensão, a rentabilidade, a sustentabilidade e a competitividade da produção de vinho e se destaca pela flexibilidade e inovação nesse setor. A existência de órgãos governamentais e não governamentais (Grape and Wine Research and Development Corporation e Australian Wine Research Institute, respectivamente) de fomento e pesquisa representam fortes pilares para a viticultura (AWRI, 2012), que começou em 1790 e está em intenso crescimento (OIV, 2012; Aylward, 2003).

Já a Nova Zelândia, apesar de não estar entre os dez maiores produtores de vinho no ano de 2011, merece destaque pelo crescente aumento na produção de vinho, sendo que no período de 2007 a 2011 teve sua produção aumentada em 59% (Tabela 1), liderando o ranking deste quesito (OIV, 2012; New Zealand Winegrowers, 2009).

**Tabela 1:** Evolução da produção de vinho no período de 2007-2011.

<b>País</b>	<b>Mhl*</b>	<b>Taxa de Crescimento</b>
<b>Argentina</b>	15473	3%
<b>Austrália</b>	11010	14%
<b>Brasil</b>	3458	-1%
<b>Bulgária</b>	1268	-29%
<b>Chile</b>	10572	29%
<b>China</b>	13200	6%
<b>França</b>	49633	9%
<b>Grécia</b>	2587	-26%
<b>Hungria</b>	2447	-24%
<b>Itália</b>	41580	-10%
<b>Nova Zelândia</b>	2350	59%
<b>Portugal</b>	5925	-2%
<b>Romênia</b>	4708	-11%
<b>Rússia</b>	6353	-13%
<b>África do Sul</b>	9336	-1%
<b>Espanha</b>	34300	-1%
<b>EUA</b>	18740	-6%

\*Mhl=milhões de litros.

Fonte: Adaptado de: Statistiques du Secteur Vitivinicole Mondial. Organização Internacional do Vinho - OIV.

Na América do Sul, Argentina, Chile e Uruguai são os principais produtores de vinho. A Argentina aparece como o 5º país no ranking mundial (Figura 2) (OIV, 2012), e maior produtor da América Latina; 21% da sua produção é vendida para o mercado externo, um indicativo da boa aceitação internacional de seu produto, comumente preparado a partir de uvas Malbec (Vino Argentino, 2012).

Segundo maior produtor de vinhos da América Latina de acordo com a OIV (2012) (Figura 2), o Chile também se destaca pelos investimentos na vitivinicultura tanto no que diz respeito a melhoria da qualidade do produto quanto no desenvolvimento de técnicas de produção menos agressivas ao meio ambiente (Wines of Chile, 2012). Em 2011, o Chile apresentou um significativo aumento em sua produção (29%) e se destaca por ser o 5º maior exportador de vinho, ficando atrás apenas de tradicionais produtores (Itália, Espanha e França) e da Austrália (OIV, 2012).

Grande parte do vinho produzido no Uruguai é feito a partir da uva Tannat, levada por imigrantes espanhóis no final dos anos 1800 e que gera bebidas tintas com coloração intensa e bastante encorpadas (Wines of Uruguay, 2012). Apesar da crescente valorização do vinho uruguaio no mercado internacional, este país ainda não se destaca quanto ao volume de sua produção ou exportação (OIV, 2012).

Por sua vez, o Brasil embora apresente um volume de produção relativamente alto, ainda não tem destaque no cenário internacional da produção de vinhos. Grande parte do produto aqui produzido é de variedade comum, ou seja, produzido a partir de uvas comuns e não de uvas viníferas, como é o caso dos vinhos finos, produtos de melhor qualidade e maior valor agregado (IBRAVIN, 2012; UVIBRA, 2012).

A primeira tentativa de implantação da vitivinicultura no Brasil se deu em 1532, pouco depois da chegada dos portugueses, com o objetivo de trazer um pouco da cultura europeia. O próximo marco da produção nacional de vinhos foi a chegada dos imigrantes italianos, que trouxeram conhecimento para a produção, mudas de uvas viníferas e também a cultura de consumo. Entretanto, em ambos esses momentos, as dificuldades de adaptação das videiras ao clima e solo brasileiro foram fatores limitantes ao avanço da produção de vinho no Brasil (Wines of Brasil, 2012).

A partir da década de 1980, investimentos em novas formas e variedades de cultivos começaram a impulsionar a indústria brasileira de vinhos, de forma que hoje já é possível encontrar vinhos brasileiros de boa qualidade. As principais regiões produtoras de vinho no Brasil se encontram no Rio Grande do Sul (Serra Gaúcha, Campanha, Serra do Sudeste e Campos de Cima da Serra); Santa Catarina (Planalto Catarinense) e no Nordeste (Vale do São Francisco), sendo que todas elas somam 83,7 mil hectares, divididas em mais de 1100 vinícolas (Wines of Brasil, 2012).

O governo brasileiro vem estimulando o aumento do consumo de vinhos, utilizando como estratégia o aumento do espaço ocupado por eles nos supermercados (Mercer, 2012).

## 2.2 Antioxidantes

Antioxidantes são moléculas capazes de impedir a oxidação de outras moléculas ou de diminuir a velocidade com que essa reação ocorre, mesmo quando em pequenas quantidades em relação ao substrato oxidável (Suh *et al*, 2011; Jaitak *et al*, 2010, Blasco; González; Escarpa, 2004; Harman, 1956).

Eles são considerados importantes agentes no combate aos radicais livres, espécies altamente reativas que são formadas pelo organismo durante os processos enzimáticos do metabolismo como a respiração celular, através de estímulos endógenos e exógenos como radiação ionizante, radiação ultravioleta ou substâncias químicas (Takashima *et al*, 2012; Kumar; Ganesan; Subba-Rao, 2008; Halliwell, 1996).

A grande preocupação com relação aos radicais livres, principalmente com as espécies reativas do oxigênio (ROS), deve-se ao fato de eles estarem relacionados a ocorrência de processos que causam danos ao organismo como a degradação de DNA, peroxidação de membrana, destruição de células endoteliais, envelhecimento, além de um grande número de doenças como o câncer, diabetes, doenças inflamatórias, problemas neurológicos, aterosclerose e outras doenças cardiovasculares (Manzano; Williamson, 2010; Fu *et al*, 2010; Perez-Tortosa *et al*, 2012; Pinchuk *et al*, 2012; Mbaebie; Edeoga; Afolayan, 2012; Marathe; Rajalakshmi; Jamdar, 2011; Miranda-Vilela *et al*, 2011; Suh *et al*, 2011; Kumar; Ganesan; Subba-Rao, 2008; Harman, 1956).

A ação dos antioxidantes, em geral, se dá pela inibição do início ou da propagação de reações de oxidação, promovendo a formação de compostos mais estáveis (Mbaebie; Edeoga; Afolayan, 2012; Sun *et al*, 2011). É possível que uma mesma substância antioxidante atue por um único mecanismo ou por um conjunto de mecanismos, *i.e.* transferência de próton e/ou elétron, ação quelante, inibição seletiva de oxidases, dependendo do meio ou espécies envolvidas (Prior *et al*, 2004).

Devido à capacidade dos antioxidantes evitarem a formação de radicais livres ou de capturarem aqueles já formados, inúmeros estudos demonstram atividade protetora que eles desempenham na saúde e no retardo do processo natural de

envelhecimento (Marathe; Rajalakshmi; Jamdar, 2011; Rahman, 2006; Horton, 2003; Macnee; Rahman, 1999).

A geração de radicais livres, dentre eles as ROS, é decorrente dos processos aeróbios e é inevitável (Valko *et al*, 2006). O próprio organismo tenta se defender deles através da produção de algumas substâncias antioxidantes como algumas enzimas (ex.: superóxido dismutase, glutathiona peroxidase e catalase); proteínas (ex.: albumina, ferritina e ceruloplasmina), alguns hormônios (ex.: melatonina, angiotensina e estrógeno) e outras biomoléculas antioxidantes de baixo peso molecular (Prior *et al*, 2005). Todavia, nem sempre elas são suficientes para combater todos os radicais livres formados, fazendo com que a suplementação de antioxidantes pela alimentação mostre-se necessária na tentativa de diminuir os efeitos danosos provocados pelos radicais livres (Cabello-Hurtado; Gicquel; Esnault, 2012; Perez-Tortosa *et al*, 2012; Miranda-Vilela *et al*, 2011; Marathe; Rajalakshmi; Jamdar, 2011; Halliwell, 1996; Harman, 1956).

Substâncias de origem natural, em geral, são consideradas mais seguras que aquelas sintéticas (Suh *et al*, 2011) e isso vem aumentando o interesse na descoberta de fontes naturais de substâncias antioxidantes (Mbaebie; Edeoga; Afolayan, 2012; Suh *et al*, 2011). As plantas representam importantes fontes de substâncias antioxidantes de origem natural (Fu *et al*, 2010; Wojdyło; Oszmianski; Czemerys, 2007), tanto para uso industrial, quanto nutracêutico (Nair; Panneerselvam; Gopi, 2012).

### **2.2.1 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas, ou seja, eles são substâncias não essenciais ao metabolismo básico, mas que desempenham funções importantes para a sobrevivência dos vegetais, auxiliando no combate a patógenos, em situações de stress e na proteção contra agressões externas, como por exemplo a radiação UV (Arribas; Martínez-Fernández; Chicharro, 2012; Boriello *et al*, 2010).

Na natureza, uma ampla variedade de compostos fenólicos pode ser encontrada, sendo que mais de dez mil compostos já foram identificados; eles são tidos como os mais importantes antioxidantes naturais (Perez-Tortosa *et al*, 2012; Nair; Panneerselvam; Gopi, 2012; Oueslati *et al*, 2012; Sun *et al*, 2011; Fu *et al*, 2010; Kumar; Ganesan; Subba-Rao, 2008; Le; Chiu; Ng, 2007; Wojdyło; Oszmianski; Czemerys, 2007; Lotito; Frei, 2004; Hättenschwiler; Vitousek, 2000).

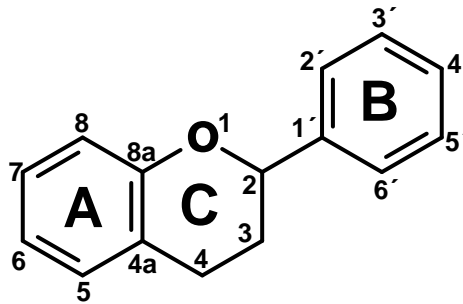
A relação entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante pode ser evidenciada pelo fato de haver correlação direta entre o teor de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante, o que já foi demonstrado por inúmeros autores (Lu *et al*, 2011; Marathe; Rajalakshmi; Jamdar, 2011; Mbaebie; Edeoga; Afolayan, 2012; Sun *et al*, 2011; Lotito; Frei, 2004; Llorach *et al*, 2003).

Diversos fatores podem influenciar no teor de compostos fenólicos presente nas plantas, dentre eles, fatores genéticos, o estágio de maturidade da planta e as condições edafoclimáticas em que a planta foi cultivada (Perez-Tortosa *et al* 2012, Marathe; Rajalakshmi; Jamdar, 2011; Wojdyło; Oszmianski; Czemerys, 2007).

Os compostos fenólicos são classificados em várias classes diferentes, dentre elas ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, óleos voláteis fenólicos (Lu *et al*, 2011).

Os flavonoides representam a maior classe de compostos fenólicos e são encontrados em grande parte dos vegetais, podendo estar presentes em diversas partes dos vegetais, como flores, frutos, sementes e principalmente na casca dos frutos; a eles é atribuída parte da cor e sabor das plantas (Nair; Panneerselvam; Gopi, 2012; Le; Chiu; Ng, 2007; Erlund, 2004; Silva *et al*, 2002). Na natureza, eles podem se apresentar isolados na forma de agliconas ou conjugados à açúcares diversos como a glicose, galactose, ramnose e arabinose, bem como em estruturas condensadas, *i.e.* ácido elágico, proantocianidinas ou polimerizados, *i.e.* taninos (Le; Chiu; Ng, 2007).

A maioria dos flavonoides é sintetizado pela via metabólica do ácido chiquímico e, estruturalmente, eles apresentam um esqueleto básico constituído por dois anéis benzênicos (denominados A e B), ligados por um anel pirano (C), que se apresenta fundido ao anel A (Figura 3).

**Figura 3:** Estrutura básica dos flavonoides

Anéis benzênicos (A e B) conectados por anel pirano (C).

As atividades antioxidante e antirradicalar dos flavonoides estão diretamente ligadas a sua estrutura e dependem da presença e da posição de determinados grupos funcionais, embora possa haver alguma contradição com relação a este tema. A presença de uma hidroxila na posição 3, bem como de uma ligação dupla entre os carbonos 3 e 4, de uma carbonila no carbono 4 e polihidroxilação dos anéis A e B são fatores determinante na atividade biológica dos compostos fenólicos, sendo que quanto maior a quantidade de hidroxilas livres, maior será a atividade antirradicalar ou redutora (Nair; Panneerselvam; Gopi, 2012; Sun *et al*, 2011; Wojdyło; Oszmianski; Czemerys, 2007; Le; Chiu; Ng, 2007; Montoro *et al*, 2005; Erlund, 2004; Silva *et al*, 2002; Cook; Samman, 1996).

A ação antioxidante dos flavonoides se dá por diferentes mecanismos, dentre eles a varredura de radicais livres, a doação de elétrons, a reação direta para formação de produtos menos reativos e a quelação de elementos de transição, sendo que esta é importante devido ao fato de que metais como o ferro e o cobre podem participar da geração de radicais livres (Nair; Panneerselvam; Gopi, 2012; Sun *et al*, 2011; Le; Chiu; Ng, 2007; Cheng; Breen, 2000; Mira *et al*, 2002; Holland *et al*, 2000).

Outra importante ação dos flavonoides é a inibição da ação de algumas das enzimas que geram como produtos radicais livres, dentre elas a cicloxigenase, lipoxigenase, a monoaminooxigenase e enzimas detoxificadoras de fase I e II (Le; Chiu; Ng, 2007; Holland *et al*, 2000).

Os flavonoides podem apresentar diversas atividades biológicas relacionadas, dentre elas ação antibacteriana, antineoplásica (Yu *et al*, 2011) antiviral (Du *et al*, 2003), antialérgica (Shin *et al*, 2005), anti-inflamatória e analgésica (Gené *et al*, 1998).

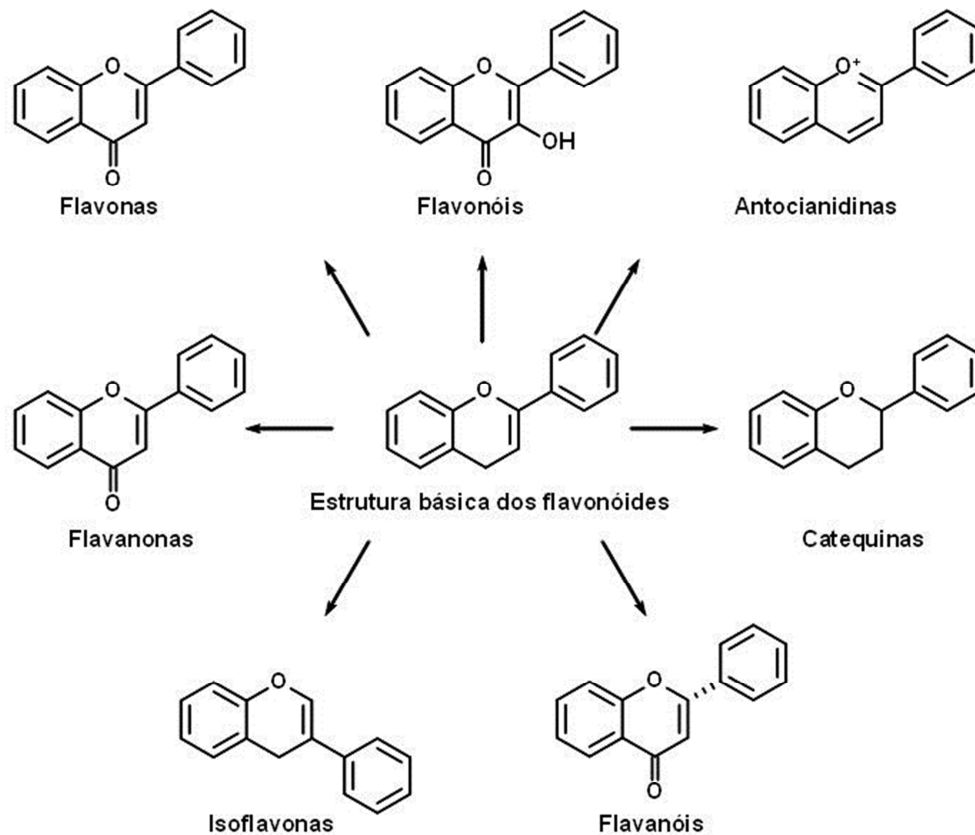
Apesar de todos os potenciais benefícios apresentados pelos flavonoides, em determinadas situações eles podem se comportar como pró-oxidantes, levando a efeitos danosos ao invés de benefícios. Dessa maneira, seu uso deve ser feito de maneira racional (Simic *et al*, 2007; Labuda *et al*, 2003).

Devido à grande variedade estrutural apresentada, os flavonoides podem ainda ser subclassificados em flavonas (ex. apigenina e luteolina), flavonóis (ex. quercetina), flavanóis, flavanonas, isoflavonas, catequinas e antocianinas (Figura 4), sendo que a posição dos grupamentos funcionais ligados aos anéis centrais é que determina a subclasse que o composto pertence (Lu *et al*, 2011; Le; Chiu; Ng, 2007).

As antocianinas representam uma importante classe de flavonoides, sendo responsáveis pela coloração que vai do vermelho ao roxo em diversos vegetais. Além disso, elas estão relacionadas a diversas atividades biológicas, como atividades antioxidante e anti-inflamatória (Veggi; Santos; Meireles, 2011; Santos; Albuquerque; Meireles, 2011).

Ao lado dos flavonoides, os ácidos fenólicos representam também importantes compostos fenólicos, são amplamente distribuídos nas espécies vegetais e apresentam pronunciada capacidade antioxidante, sendo considerados por alguns autores como a maior classe de compostos fenólicos (Wojdyło; Oszmianski; Czemerys, 2007). Os ácidos fenólicos podem ser subdivididos em duas classes: os ácidos hidroxicinâmicos – sendo alguns exemplos o ácido cafeico, ácido ferrúlico e ácido cumarínicos – e ácidos hidroxibenzóico, com o ácido gálico e ácido vanílico como representantes (Lu *et al*, 2011).

**Figura 4:** Subclasses de flavonoides.



### 2.2.1.1 Oxidação eletroquímica dos flavonoides

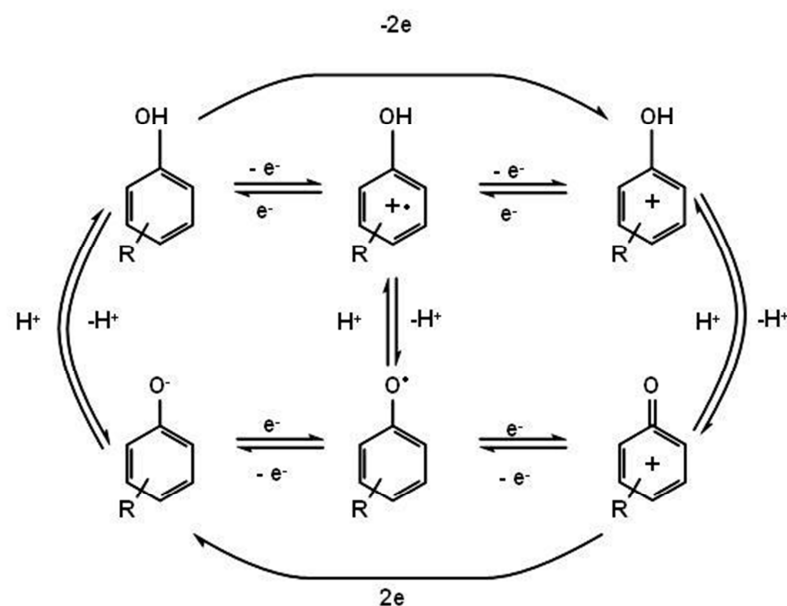
A capacidade dos flavonoides atuarem como antioxidantes em meios biológicos exercendo, assim, o papel protetor da saúde, pode ser explicada pelo fato de que eles apresentam maior facilidade para doar elétrons do que para ganhar, sendo que as reações de transferência de elétrons das quais eles participam ocorrem em um potencial próximo àquele encontrado nos meios biológicos. Além disso, a energia de ativação necessária para que eles realizem a transferência do elétron é baixa (Havsteen, 2002).

As técnicas eletroanalíticas são capazes de demonstrar o potencial em que os flavonoides realizam a transferência de elétrons, prevendo, assim, a atuação deles como antioxidantes nos meios biológicos (Masek; Zaborski; Chrzescijanska, 2011), sendo que os compostos considerados melhores antioxidantes são aqueles cuja

oxidação ocorre em potenciais menores, ou seja, que se oxidam com maior facilidade (Arribas; Martínez-Fernández; Chicharro, 2012; Mannino *et al*, 1998).

O início da oxidação eletroquímica dos fenóis e seus derivados, como os flavonoides, se dá com a transferência de um elétron dele para o eletrodo, podendo gerar tanto a formação de fenolatos quanto a de radicais fenoxil (Figura 5) (Arslan; Yazici; Erbil, 2005).

**Figura 5:** Vias de oxidação eletroquímica para compostos fenólicos.



Fonte: Adaptado de: Do Couto, R.O. and Gil, E.S., Flavonoide Electrochemistry, a review on the electroanalytical applications, Rev. Bras. Farmacog. *in press*.

Ambas as espécies formadas podem sofrer novamente processos de oxidação ou sofrer processo de conjugação, formando compostos poliméricos ou oligômeros semelhantes as quinonas (Arslan; Yazici; Erbil, 2005).

A polimerização de fenóis se dá a partir dos fenolatos formados, que podem reagir com outras espécies em solução ou com outras moléculas de fenol, neste caso, formando um radical para-dimérico. Esse radical, por sua vez, pode ser oxidado com a perda de um próton para formar um dímero neutro ou pode se ligar a outra molécula. No caso dos dímeros, eles podem ser oxidados levando a formação de oligômeros e polímeros (Arslan; Yazici; Erbil, 2005; Gattrell; Kirk, 1992).

Os polímeros formados, por sua vez, podem gerar a formação de filmes insolúveis e inertes na superfície do eletrodo, o que resulta na passivação dele e leva à uma rápida diminuição na corrente elétrica. É importante ressaltar que alguns fatores influenciam na via oxidativa e, conseqüentemente, na quantidade de cada um dos produtos a serem formados. Dentre eles, pode-se citar o pH, o solvente utilizado, os aditivos, o potencial do eletrodo, a densidade de corrente e a concentração de espécies em solução. Nos casos em que a concentração de compostos fenólicos é mais alta, a via de polimerização dos fenóis na superfície do eletrodo é favorecida, enquanto que a formação de quinonas é favorecida quando as concentrações são menores (Ferreira *et al*, 2006; Arslan; Yazici; Erbil, 2005; Gattrell; Kirk, 1992).

As reações de oxidação dos flavonoides são, normalmente, acopladas a mecanismos de reações químicas homogêneas (em solução), em que processos de primeira ordem e de ordem zero são encontrados (Hendrickson; Kaufman; Lunte, 1994).

O grupamento catecol no anel B é uma característica de compostos com alta capacidade antioxidante visto que a oxidação do grupamento 3'4'-di-hidroxi ocorre em potenciais inferiores a 0,5V, considerado um potencial baixo. Esta reação é reversível e envolve a transferência de dois elétrons e dois prótons (Jovanovic *et al*, 1998).

Em pH básico, a deprotonação ocorre mais facilmente que em pH ácido, o que indica uma forte influência do pH na oxidação dos flavonoides. Em meios ácidos, essa reação ocorre em potenciais maiores que 0,8 V e tal característica é importante para a estabilidade dos flavonoides no estômago, que apresenta pH em torno de 1,5 e 2,0, garantindo biodisponibilidade desses compostos após a ingestão (Jovanovic *et al*, 1998).

O fenômeno de ressonância nas formas quinônicas com substituintes nas posições para e orto é responsável pela reversibilidade das reações visto que ela é capaz de estabilizar os compostos formados (Nasr, 2005).

Os compostos derivados do resorcinol, por sua vez, sofrem processos irreversíveis de oxidação, o que pode ser explicado pela ausência de ressonância

nos compostos meta substituídos, fazendo com que não haja estabilização do radical, elevando, assim, o potencial em que ocorre a oxidação para cerca de 1,0 V. Ao contrário do resorcinol, os produtos de oxidação formados são capazes de sofrer processos reversíveis (Janeiro; Oliveira-Brett, 2005).

A diferença na reversibilidade da reação do catecol e do resorcinol pode ser observada através da voltametria de onda quadrada, em que a ausência do pico catódico no voltamograma do resorcinol é um indicativo da irreversibilidade da reação de oxidação.

Os monofenóis, por sua vez, são oxidados em potenciais altos, assim como o compostos derivados do resorcinol, e apresentam oxidação irreversível em todo o intervalo de pH (Corduneanu, 2006). Os produtos resultantes da oxidação tendem a formar filmes eletroativos na superfície do eletrodo, e estes, por sua vez, se oxidam de forma reversível em potenciais menores (Enache; Oliveira-Brett, 2011; Janeiro; Oliveira-Brett, 2007).

### **2.3 Métodos para avaliação da capacidade antioxidante**

Existe hoje uma ampla variedade de métodos disponíveis para a avaliação da capacidade antioxidante de diversos tipos de amostras, baseados em diferentes princípios (Hayes *et al*, 2011). Em verdade, uma única técnica não garante a avaliação fidedigna de todos os compostos envolvidos no poder antioxidante de uma amostra complexa. Deste modo, é frequente a utilização de métodos complementares, capazes de medir diferentes características (Terpinca *et al*, 2012).

Essa variedade de métodos tem como desvantagem a dificuldade na comparação dos resultados obtidos em diferentes laboratórios, visto que cada laboratório pode se valer de um determinado método a que ele tenha acesso e nem sempre existe uma boa correlação entre os diferentes métodos (Nair; Panneerselvam; Gopi, 2012; Pinchuk *et al*, 2012). Embora, a baixa ou falta de correlação seja inerente à métodos que se baseiam em critérios diferentes, esse problema também pode ocorrer em métodos baseados em princípios comuns (Nair; Panneerselvam; Gopi, 2012; Pinchuk *et al*, 2012).

Dentre os métodos mais comumente utilizados, pode-se citar o FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*), a Avaliação da Atividade Quelante de íons  $\text{Fe}^{2+}$ , o ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), o Folin-Ciocalteu, o ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzoiltiazolína-6-sulfônico), e o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (Pinchuk *et al*, 2012).

No método FRAP, mede-se a capacidade da amostra em reduzir íons férricos em íons ferrosos (Balogh; Hegedüs; Stefanovits-Banyai, 2010). Já no método do tiocianato férrico, mede-se a capacidade da amostra em reduzir a peroxidação do ácido linoleico. No teste do Cianeto Férrico, mede-se a capacidade da amostra em reduzir o complexo  $\text{Fe}^{3+}(\text{CN}^-)^6$  to  $\text{Fe}^{2+}(\text{CN}^-)^6$ , sendo que mede-se a absorbância do complexo formado após a adição de excesso de  $\text{Fe}^{3+}$  (Gülçin, Elmastas; Aboul-Enein, 2012).

Na avaliação da atividade quelante de íons  $\text{Fe}^{2+}$ , a formação do complexo  $\text{Fe}^{2+}$ -ferrozina confere uma coloração rósea a solução. Quanto maior a quantidade de antioxidantes presentes na amostra, maior será a reação deles com os íons  $\text{Fe}^{2+}$  e, portanto, menor a absorbância a 562 nm (Gülçin; Elmastas; Aboul-Enein, 2012; Lima *et al*, 2010; Santos *et al*, 2007).

No método ORAC, mede-se a inibição que os antioxidantes promovem na oxidação de uma proteína fluorescente (ou da fluoresceína, em uma versão mais moderna do método) quando em presença de íons cobre ou AAPH, um radical indutor de radicais livres. A oxidação deles promove a diminuição da fluorescência, o que permite a análise da cinética de oxidação. O princípio do método se baseia na captura de radicais livres, sendo o mais utilizado dentre as técnicas que apresentam mecanismo de ação semelhante (Pinchuk *et al*, 2012). A principal desvantagem desse método está relacionada à necessidade de utilização de equipamento específico para análise da amostra (Thomas *et al*, 2011).

### 2.3.1 Folin-Ciocalteu

O método de Folin-Ciocalteu destina-se a determinação dos fenóis totais presentes em amostras. Ele foi desenvolvido em 1965 a partir de modificações de

um método previamente existente, o Folin-Denis, que tinha como objetivo a determinação de tirosina em proteínas e apresentava uma séria desvantagem: a precipitação, que interfere na leitura por espectrofotometria (Ndhlala; Moyo; Staden, 2010; Singleton; Rossi-Jr, 1965).

No método de Folin-Ciocalteu, os compostos fenólicos são oxidados por uma mistura de ácido fosfotúngstico ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) com ácido de fosfomolibdico túngstico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), também chamado reagente de Folin-Ciocalteu, formando íons superóxido. Estes íons reagem com os óxidos de tungstênio ( $W_8O_{23}$ ) e de molibdênio ( $Mo_8O_{23}$ ), que, por sua vez, apresenta coloração azul intensa e boa absorbância no comprimento de onda de 725 nm. O teor de compostos fenólicos é expresso em equivalentes de ácido gálico (GAE), que normalmente é usado como o padrão para esta reação (Georgé *et al*, 2005; Prior *et al*, 2005).

Para que a determinação dos fenóis totais seja confiável, algumas condições devem ser obedecidas: o pH deve ser alcalino; deve-se utilizar a quantidade certa de reagente; a temperatura bem como o tempo da reação devem ser adequados para o desenvolvimento de cor (Ndhlala; Moyo; Staden, 2010; Prior *et al*, 2005).

A principal desvantagem relacionada a esse método deve-se ao fato de que o reagente de Folin-Ciocalteu pode reagir também com outras substâncias potencialmente presentes em amostras complexas, como, por exemplo, o ácido ascórbico, açúcares, ácidos orgânicos, aminas aromáticas, proteínas e também algumas substâncias inorgânicas como sulfato de ferro, nitrito de potássio, fosfato de sódio e sulfato de manganês (Ndhlala; Moyo; Staden, 2010).

### **2.3.2 ABTS<sup>+</sup>**

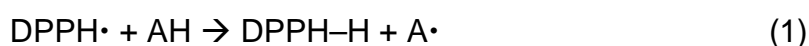
Outro método bastante popular para avaliação da atividade antioxidante é o método de atividade antirradicalar ABTS<sup>+</sup>. Neste método o radical é previamente gerado a partir de reação na qual se emprega um oxidante forte, em geral o persulfato de amônia. Uma vez gerado, o radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzoiltiazolina-6-sulfônico) reage com os antioxidantes da amostra, regenerando a sua forma mais estável. Ao final, é determinada a concentração do íon ABTS<sup>+</sup> remanescente por

espectrofotometria, a 734 nm, e o valor é comparado com a absorvância de antioxidantes conhecidos, como o BHA, BHT,  $\alpha$  – tocoferol e Trolox, um análogo hidrossolúvel do  $\alpha$  – tocoferol. Esse método apresenta as vantagens de ser estável em uma ampla faixa de pH (0 a 7) e o fato de o radical ser solúvel em meios aquosos e alcoólicos, entretanto, uma desvantagem reside no fato de o radical ter de ser gerado previamente a realização do teste, reação que só se completa após 16 horas (Caiconte, 2012; Gülçin, Elmastas; Aboul-Enein, 2012).

### 2.3.3 DPPH•

O 2,2-difenil-1-picril-hidrazila, mais conhecido pela sigla DPPH•, é um radical comercial estável capaz de sofrer reações de redução quando da presença de substâncias antioxidantes (Nair; Panneerselvam; Gopi, 2012). Esse método segue um princípio similar ao ABTS<sup>+</sup>• e foi desenvolvido por Blois, em 1958.

Dois mecanismos podem estar envolvidos no processo de redução do DPPH•: a transferência de átomos de hidrogênio ou de um único elétron, como pode ser demonstrado pelas reações 1 e 2 abaixo (Milardović; Ivekovic; Grabarić, 2006; Prior *et al*, 2005):



Quando as substâncias antioxidantes potencialmente presentes na amostra realizam tais transferências, seja do hidrogênio ou do elétron, o DPPH• é convertido no radical  $\alpha$ - $\alpha$ -difênil- $\beta$ -picrilhidrazina, que é mais estável. O radical DPPH• é inicialmente roxo e a reação faz com que a cor mude para amarelo, o que gera uma diminuição na absorvância da amostra na faixa de 515 a 517 nm (Hayes *et al*, 2011; Gülçin, Elmastas; Aboul-Enein, 2012).

A capacidade antioxidante da amostra pode ser determinada pela diminuição da absorvância da solução, que apresenta correlação direta com a capacidade antioxidante dos compostos que estão presentes na amostra em análise, sendo que esta segunda forma de avaliação é a mais comumente utilizada (Mbaebie; Edeoga; Afolayan, 2012).

Um dos poucos radicais estáveis de Nitrogênio, o DPPH• apresenta a vantagem de não ter que ser gerado previamente a realização do teste, ao contrário do que acontece no método de ABTS<sup>+</sup>•. A ampla utilização da técnica pode ser explicada por ela ser simples e rápida além de necessitar de um único equipamento para realização dos testes, um espectrofotômetro (Prior *et al*, 2005).

Dentre as desvantagens da técnica de DPPH•, está o fato de ele ser solúvel apenas em meio alcoólico (Caiconte, 2012). Além disso, muitos antioxidantes reagem com ele de maneira muito lenta ou, até mesmo, não reagem devido ao impedimento estérico, enquanto moléculas menores tendem a reagir mais facilmente com o radical (Cabello-Hurtado; Gicquel; Esnault, 2012).

Outra desvantagem reside no fato de que pode haver interferência de outras moléculas que possuam absorção na mesma faixa que o DPPH•, como por exemplo, os carotenoides, o que pode dificultar a interpretação dos resultados (Balogh; Hegedüs; Stefanovits-Banyai, 2010; Prior *et al*, 2005).

Apesar da grande variedade de métodos disponíveis para avaliação da capacidade antioxidante, ainda não existe um método que seja considerado padrão ouro para tais análises. Na ausência de um método padrão ouro, os métodos mais comumente utilizados acabam sendo considerados padrão ouro, ainda que não sejam melhores, mais fáceis, precisos e exatos que outros métodos (Pinchuk *et al*, 2012).

### **2.3.4 Métodos eletroanalíticos**

Os métodos eletroanalíticos despontam como uma ferramenta muito útil na determinação de antioxidantes presentes em amostras (Reis *et al*, 2009; Oliveira-Roberth *et al*, 2012) devido ao fato de que esses compostos atuam como agentes redutores, sendo facilmente oxidados na superfície de eletrodos (Blasco; González; Escarpa, 2004).

Os métodos eletroanalíticos se valem das propriedades elétricas dos analitos presentes em uma determinada amostra para fornecer dados qualitativos ou

quantitativos (Reis *et al*, 2009; Gonçalves *et al*, 2011; Skoog *et al*, 2009). Eles são capazes de fornecer informações acerca da transferência de elétrons que ocorre na superfície do eletrodo de trabalho e apresentam várias vantagens quando comparado a outros métodos, dentre elas, um baixo limite de detecção (alta sensibilidade), boa seletividade, rapidez, simplicidade de análise e um baixo consumo de reagentes, o que implica em um menor impacto ambiental (Gonçalves *et al*, 2011; Blasco; González; Escarpa, 2004).

Outra grande vantagem das técnicas eletroanalíticas quando comparadas aos métodos espectrofotométricos para determinação da atividade antioxidante de amostras reside no fato de que estes dependem da geração de substratos oxidados para que os antioxidantes atuem e, assim, seja determinada a presença, quantidade e/ou capacidade antioxidante desses compostos. Os métodos eletroanalíticos, por outro lado, se baseiam nas propriedades elétricas dos analitos (antioxidantes), não sendo necessária a geração prévia ou uso de espécies oxidadas (He *et al*, 2009; Huang, Gao; Hageman, 2004; Reis *et al*, 2009; Blasco; González; Escarpa, 2004; Mannino *et al*, 1998).

Dentre as técnicas eletroanalíticas, as voltamétricas ganham destaque nas análises de atividade antioxidante (Oliveira-Roberth *et al*, 2012). A voltametria se baseia em três parâmetros que ocorrem durante a eletrólise: a corrente elétrica, a voltagem e o tempo (Reis *et al*, 2009) e estudam os fenômenos que ocorrem na interface entre o eletrodo e a fina camada de solução que o circunda (Skook *et al*, 2009).

O primeiro passo na voltametria é representado pela aplicação de um potencial a uma célula eletroquímica, composta por três eletrodos, o de referência, o de trabalho e o auxiliar. O potencial é aplicado na forma de varredura, ou seja, a velocidade dele varia de forma constante em função do tempo decorrido. A aplicação do potencial promove a ocorrência de reações de oxirredução (reações faradaicas) na superfície do eletrodo de trabalho, o que gera uma corrente elétrica. A medida dessa corrente em função do tempo dá origem uma curva, o voltamograma. A intensidade da corrente gerada está relacionada com a quantidade de antioxidantes ou espécies eletroativas presentes na amostra (Skoog *et al*, 2009; Castro *et al*, 1997; Gil, 2007).

A voltametria permite tanto a análise de substâncias isoladas quanto de amostras complexas, como medicamentos fitoterápicos, comidas e bebidas. No primeiro caso, são geradas informações importantes acerca da caracterização eletroquímica dessas substâncias, mecanismo de ação e relação estrutura-atividade (Makhotkina; Kilmartin, 2012; Reis *et al*, 2009), sendo possível que seja avaliada a influência de fatores intrínsecos, (ex. das ligações duplas e de substituintes), bem como extrínsecos, (ex. influência do pH e dos solventes utilizados (Reis *et al*, 2009).

Por outro lado, apesar de fornecer importantes informações acerca dos compostos antioxidantes presentes em uma amostra complexa, a voltametria por si só não é capaz de definir ao certo quais são as espécies ali presentes (Oliveira-Roberth *et al*, 2012). Entretanto, é possível que seja feita uma previsão acerca dos compostos ou grupos que originaram um determinado pico com base no potencial em que ocorre a oxidação deles (Enache; Oliveira-Brett, 2011). A comparação entre voltamogramas de espécies puras e amostras complexas também permite que sejam feitas presunções acerca da natureza dos antioxidantes presentes na amostra (Reis *et al*, 2009).

Além disso, é possível que seja avaliada a eficiência desses antioxidantes, sendo que, como já foi dito anteriormente, quanto menor é o potencial em que ocorre a oxidação, maior é sua capacidade doadora de elétrons e, conseqüentemente, seu poder redutor (Arribas; Martínez-Fernández; Chicharro, 2012; Mannino *et al*, 1998).

Por sua vez, considerando-se a natureza eletroativa dos compostos fenólicos, é possível, segundo a Lei de Faraday, determiná-los quantitativamente (Makhotkina; Kilmartin, 2012; Reis *et al*, 2009).

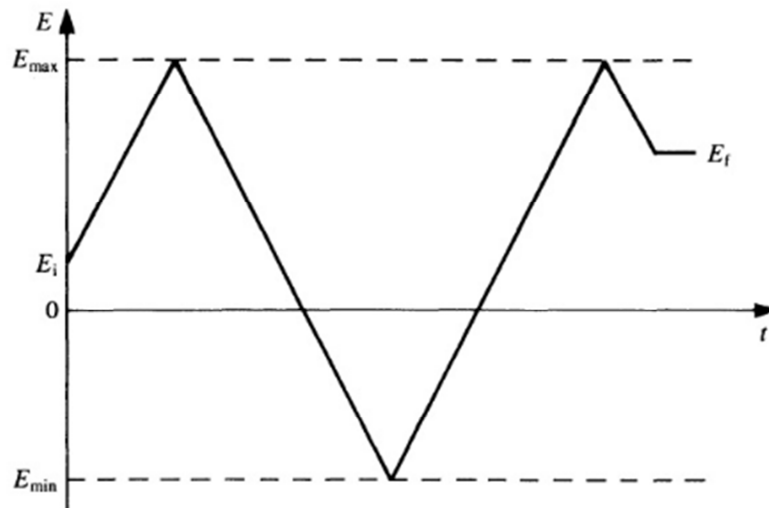
Para tanto, existem diversos tipos de métodos eletroanalíticos, a destacar os métodos volta-amperométricos, que dividem-se em amperometria, voltametria cíclica (CV), voltametria de pulso diferencial (DPV) e voltametria de onda quadrada (SWV). Elas serão detalhadas nos tópicos a seguir.

### 2.3.4.1 Voltametria cíclica (CV)

Dentre as técnicas voltamétricas mais comumente utilizadas, pode-se citar a CV (Makhotkina; Kilmartin, 2010; Blasco; González; Escarpa, 2004).

A voltametria cíclica, originalmente, consiste em um método de varredura em que um potencial com forma triangular é aplicado a um eletrodo, nomeadamente eletrodo de trabalho, imerso em uma solução, até que seja atingido o potencial de inversão, retornando ao potencial de partida (Figura 6). Essa inversão dos potenciais é chamada de ciclização do potencial e gera voltamogramas em que podem ser observadas tanto a onda de oxidação (anódica) quanto a de oxidação (catódica). Hoje, com a sofisticação de softwares, é possível em CV submeter o eletrodo e, conseqüentemente, a amostra a programas de varredura diferenciados, podendo iniciar e finalizar a varredura em potenciais distintos (Brett; Oliveira-Brett, 1993).

**Figura 6:** Variação do potencial aplicado ao eletrodo na voltametria cíclica.



Fonte: Brett; Oliveira-Brett, 1993.

A rampa de potencial pode ser aplicada no sentido de redução (catódico) ou oxidação (anódico), polarizando o eletrodo negativa ou positivamente. Na ausência de espécies eletroativas, a célula eletroquímica funciona como capacitor, de modo

que cátions e ânions migram respectivamente para cátodo e ânodo, sem transferir efetivamente suas cargas. As curvas tensão-corrente (voltamogramas) são acompanhadas, portanto, pela ausência de picos, sendo que, quanto mais resistivo for o meio eletrolítico e mais positivos ou negativos forem os potenciais aplicados, maior será o nível de corrente capacitiva observado.

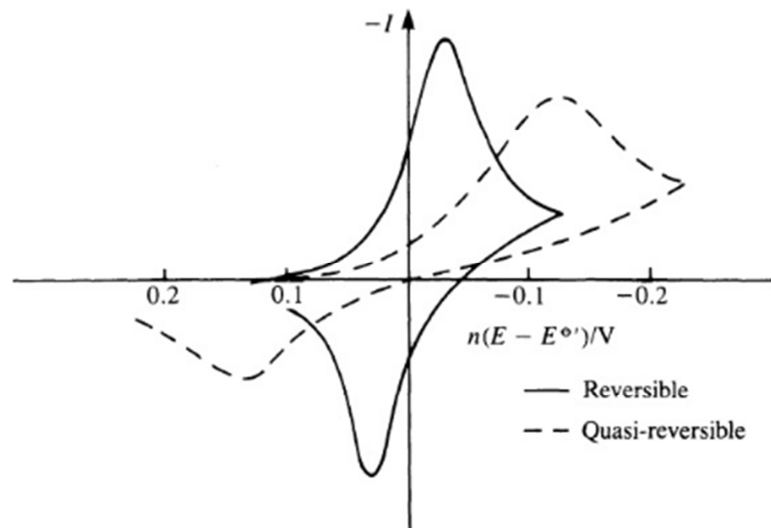
Por sua vez, a presença de compostos eletroativos na amostra em que o eletrodo está imerso leva a formação de picos de corrente,  $I_p$ , gerados no respectivo potencial de redução e/ou oxidação relativo à espécie em análise.

Os métodos voltamétricos estudam os fenômenos que ocorrem na interface entre o eletrodo e a fina camada de solução que o circunda (Skook *et al*, 2009). Em outras palavras, caso uma espécie eletroativa em sua forma reduzida seja submetida a potenciais cada vez mais positivos, ao encontrar no eletrodo nível de polarização suficientemente positivo ( $E_{pa}$ ), transfere para este elétron(s), se oxidando. Em se tratando de processos redox reversíveis, ao reverter o potencial, as espécies recém oxidadas nesta interface são reduzidas a forma original, quando o eletrodo atinge nível de polarização suficientemente negativo. O eletrodo, neste caso, atua como um catalisador eletroquímico de reação redox, cuja reversibilidade é avaliada em função da diferença de potenciais anódicos e catódicos ( $\Delta E = E_{pc} - E_{pa}$ ) e picos de corrente de redução e oxidação. Em teoria, valores de  $\Delta E < 60$  mV e razões  $I_{pa}/I_{pc} \sim 1$  corresponderiam a processos reversíveis, valores intermediários a processos quase irreversíveis (Figura 7). Já os processos irreversíveis são aqueles em que, uma vez oxidada ou reduzida, a espécie não se regenera ao reverter o potencial aplicado ao eletrodo (Brett; Oliveira-Brett, 1993).

A corrente de difusão gerada pela CV é proporcional à concentração do analito, o que permite fazer estimativas sobre a quantidade de antioxidantes presentes na amostra (Oliveira-filho, 2006).

Dentre as vantagens oferecidas pela CV pode-se citar uma boa sensibilidade, não destruição das amostras, possibilidade de avaliação do comportamento dos antioxidantes em uma amostra, da reversibilidade das reações envolvidas, da presença de reações acopladas e de mecanismos de transferência de carga e próton (Diculescu *et al*, 2012; Blasco; González; Escarpa, 2004).

**Figura 7:** Voltamogramas cíclicos característicos de reação reversível (—) e irreversível (---).



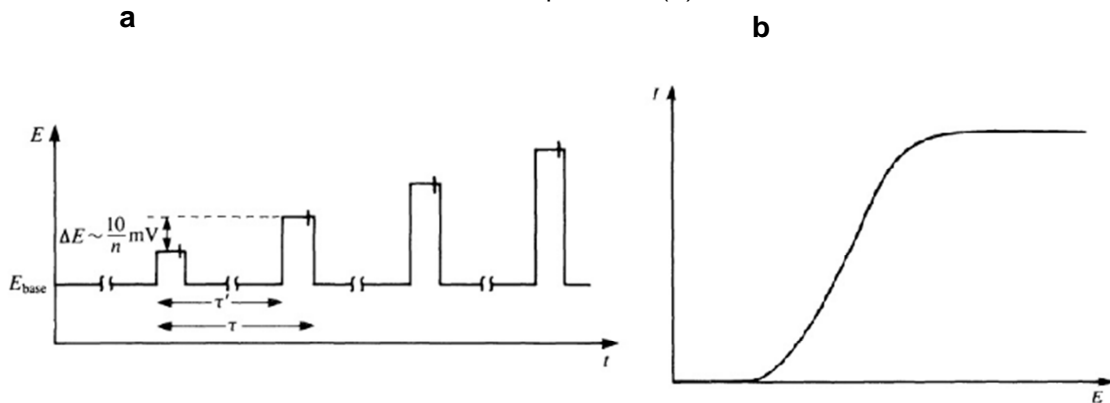
Fonte: Brett; Oliveira-Brett, 1993.

#### 2.3.4.2 Voltametria de Pulso Diferencial (DPV)

A DPV representa uma outra técnica voltamétrica bastante útil para realização de análises eletroanalíticas. Para realização desta técnica, inicialmente é escolhido um potencial inicial ( $E_{\text{base}}$ ), normalmente em que não haja corrente faradaica e, em sequência, pequenos pulsos com amplitude crescente são aplicados. A duração dos pulsos, em geral, varia de 5 a 100 ms, sendo que a corrente é medida ao início e ao final dele e a diferença entre eles é registrada. Outra característica importante do pulso de potencial aplicado é que o incremento dele deve ser constante e igual ao  $E_{\text{base}}$  (Brett; Oliveira-Brett, 1993). Na Figura 8 podem ser observados dois esquemas referentes a DPV.

A DPV apresenta algumas vantagens em relação a CV, sendo a principal uma maior sensibilidade, conquistada através da diminuição da corrente capacitiva, um fenômeno decorrente da dupla camada elétrica. Essa diminuição ocorre devido ao pequeno intervalo de amostragem das correntes, fazendo com que esses valores sejam bastante próximos um do outro (Oliveira; Reis, 2010).

**Figura 8:** a) esquema de aplicação dos pulsos a partir do  $E_{\text{base}}$ ; b) esquema da corrente ( $i$ ) em função do potencial ( $E$ ).



Fonte: Brett; Oliveira-Brett, 1993.

Além disso, a DPV permite melhor observação dos processos de transferência de elétron, identificando quando eles estão ou não acoplados a transferência de prótons e a formação de produtos eletroativos (Diculescu *et al*, 2012), além de que a DPV apresenta a melhor resolução de picos quando comparada a outras técnicas eletroanalíticas, o que possibilita a caracterização deles (Masek; Zaborski; Chrzescijanska, 2011).

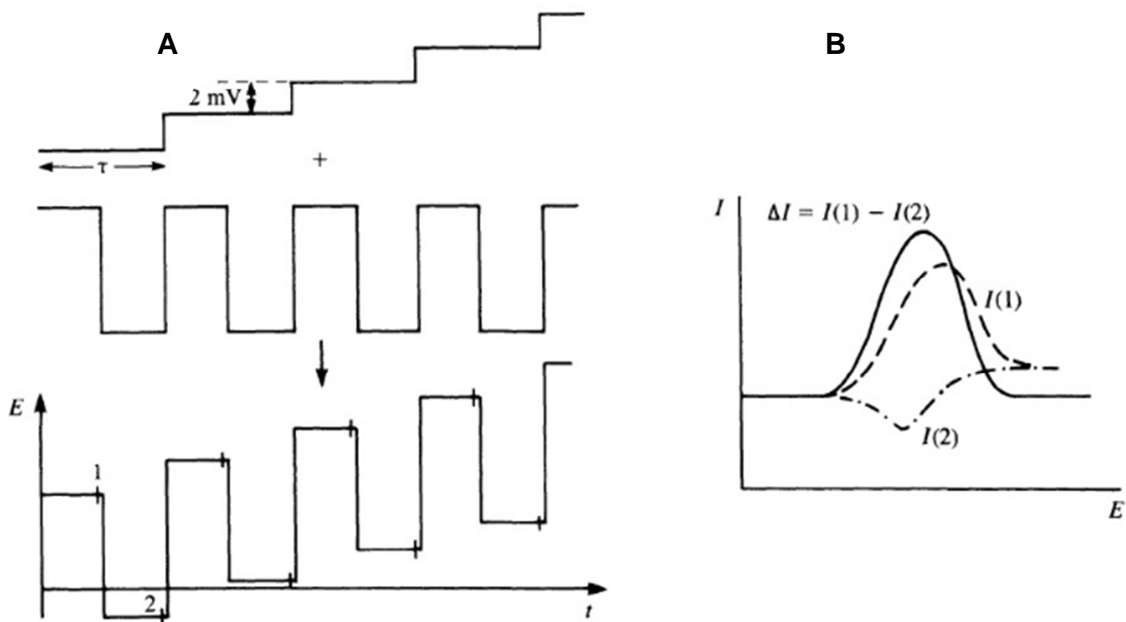
### 2.3.4.3 Voltametria de onda quadrada (SWV)

Na SWV, a curva voltamétrica corresponde a uma onda quadrada sobreposta a um degrau de potencial, sendo que um ciclo completo de onda quadrada corresponde a um degrau da escada. A corrente é amostrada tanto no sentido da oxidação (positivo) quanto no da redução (negativo), gerando, assim, um pico para cada um dos processos, o que representa uma vantagem – a possibilidade da análise do processo de oxidação e redução em um único escaneamento da amostra. A taxa de varredura da SWV pode chegar a  $1\text{ V s}^{-1}$ , valor bem superior ao da DPV ( $1$  a  $10\text{ mV s}^{-1}$ ) e essa maior velocidade confere algumas vantagens a SWV, como um menor consumo de espécies eletroativas, o que leva a menor adsorção de espécies na superfície do eletrodo (Janeiro; Oliveira-Brett, 2005; Brett; Oliveira-Brett, 1993).

Na Figura 9, podem ser observados o esquema de aplicação dos pulsos em forma de escada na SWV, bem como um voltamograma típico da técnica de onda quadrada.

Outra vantagem da SWV, dessa vez em relação à CV, é uma maior capacidade de discriminação da corrente capacitiva, o que lhe confere um intervalo dinâmico mais amplo e uma maior sensibilidade. Devido à maior sensibilidade, é possível que as análises por SWV sejam feitas em concentrações menores que nas outras voltametrias. Ademais, ela apresenta uma corrente elétrica mais intensa, tanto no sentido da oxidação quanto da redução, gerando picos mais definidos, mais facilmente identificáveis, melhorando, assim, a exatidão do método (Dogan-Topal *et al*, 2010).

**Figura 9:** A) esquema de aplicação dos pulsos em forma de escada ; B) voltamograma típico.



Fonte: Brett; Oliveira-Brett, 1993.

### 2.3.5 Justificativa

A produção de bebidas fermentadas representa tanto uma alternativa para melhor aproveitamento de frutas, especialmente aquelas cuja perecibilidade acontece em um período curto após o amadurecimento e colheita, como também uma forma de geração de renda para pequenos trabalhadores rurais, através da manufatura de produtos de alto valor agregado.

A determinação da presença e da quantidade de compostos fenólicos em vinhos e bebidas fermentadas é importante do ponto de vista do controle de qualidade, visto que eles desempenham função nas características organolépticas desses produtos e também na avaliação do potencial nutracêutico delas.

Existem, hoje, uma gama de métodos capazes de avaliar a atividade antioxidante de diversos tipos de amostras, mas, ainda assim, existe demanda para o desenvolvimento de novos métodos para essa finalidade em virtude de falhas e desvantagens inerentes a cada um dos métodos existentes.

As técnicas voltamétricas são capazes de determinar a presença de compostos eletroativos, como é o caso dos compostos fenólicos, além de serem fáceis, baratas e reproduzíveis, representando, assim, uma ferramenta em potencial para a análise da presença de compostos fenólicos em vinhos.

Blasco, González e Escarpa (2004) levantaram a necessidade de criação de um índice eletroanalítico que propiciasse uma melhor e mais fácil comparação entre diferentes amostras com atividade antioxidante. Tais autores chegaram a propor um índice, entretanto, o índice por eles proposto apresentava uma abordagem estritamente qualitativa, classificando apenas compostos puros como tendo alto poder antioxidante ou baixo poder antioxidante, considerando-se o potencial em que a reação ocorre.

Os trabalhos que analisam a atividade antioxidante de amostras de vinho em geral se valem de um pequeno número de amostras que, normalmente, pertencem à região de origem do trabalho em questão; poucos são os trabalhos encontrados na literatura que estudam uma grande variedade de amostras de vinhos de diferentes

nacionalidades e qualidade, a fim de comparar a atividade antioxidante por eles apresentadas.

### 3 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar o potencial antioxidante de vinhos de diferentes nacionalidades e variedades (tinto, branco, rosê, espumante etc), bem como de bebidas fermentadas de jabuticaba, comparando-se os resultados obtidos para cada um.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Comparar a atividade antioxidante de bebidas fermentadas de jabuticaba nas variedades tinta, rosê e branca bem como a atividade antioxidante de bebida destilada (aguardente) de jabuticaba.
- Comparar a atividade antioxidante de diversas bebidas de uva (vinhos, sucos e bagaceira) utilizando-se de diferentes métodos.
- Comparar os resultados de voltametria com o de técnicas mais conhecidas para avaliação da atividade antioxidante.
- Avaliar a influência do pH nas análises por voltametria.
- Propor um índice eletroanalítico que permita a comparação do potencial antioxidante determinado por DPV entre diferentes amostras.
- Comparar a atividade antioxidante de vinhos de diferentes nacionalidades e produzidos a partir de diferentes uvas determinada por um método clássico (DPPH) e inovador (DPV).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Análises da atividade antioxidante de bebidas de jabuticaba**

#### **4.1.1 Amostras**

Foram analisadas quatro bebidas produzidas a partir da jabuticaba, sendo três fermentados nas variedades tinto, rosê e branco e também uma bebida destilada (aguardente) produzida a partir da jabuticaba.

O fermentado de jabuticaba é uma bebida tradicionalmente caseira, sendo produzida em pequena escala por agricultores e pequenos proprietários rurais. Hoje é possível encontrar essa bebida industrializada, entretanto, ainda são poucas as variedades comerciais encontradas. Dada a escassez de fabricantes ou marcas disponíveis nos mercados locais, apenas uma amostra de cada variedade foi avaliada. Tais amostras são produzidas no município de Hidrolândia – GO.

Todas as amostras foram adquiridas no Mercado Central de Goiânia - GO. As amostras foram mantidas sob refrigeração a 4°C até o momento da análise. Na Figura 10 são mostrados os fermentados tinto e branco.

#### **4.1.2 Reagentes**

O ABTS, o reagente de Folin-Ciocalteu, o Trolox e o ácido gálico (GA), foram todos adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Para o preparo das soluções eletrolíticas, foram utilizados cloreto de potássio, fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico.

Todas as soluções de eletrólitos de suporte e soluções-tampão utilizadas eram de grau analítico e foram preparadas usando água purificada de um sistema Millipore Milli-Q (condutividade  $\leq 0,1 \mu\text{Scm}^{-1}$ ) (Millipore S.A., Molsheim, França).

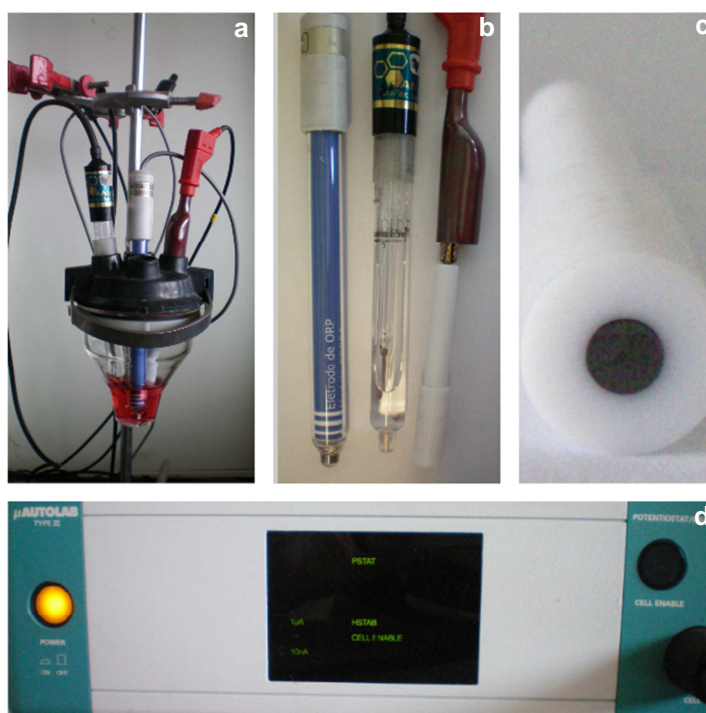
#### 4.1.4 Análises eletroquímicas

##### 4.1.4.1 Equipamentos e acessórios

As medidas foram feitas em uma célula eletroquímica monocompartimental com três eletrodos, sendo eles o eletrodo de carbono vítreo (ECV -  $\varnothing = 4$  mm) como eletrodo de trabalho, um eletrodo de Ag/AgCl (3 mol L<sup>-1</sup> KCl) como eletrodo de referência e um eletrodo de Platina como eletrodo auxiliar.

As análises voltamétricas foram feitas em potenciostato/galvanostato  $\mu$ Autolab III<sup>®</sup> integrado ao software GPSE 4,9<sup>®</sup> (Eco-Chemie, Utrecht, The Netherlands). Na Figura 11 são mostrados os eletrodos, a célula eletroquímica e o potenciostato/galvanostato utilizados para as análises.

**Figura 11:** Aparatos e equipamentos usados nas análises eletroanalíticas.

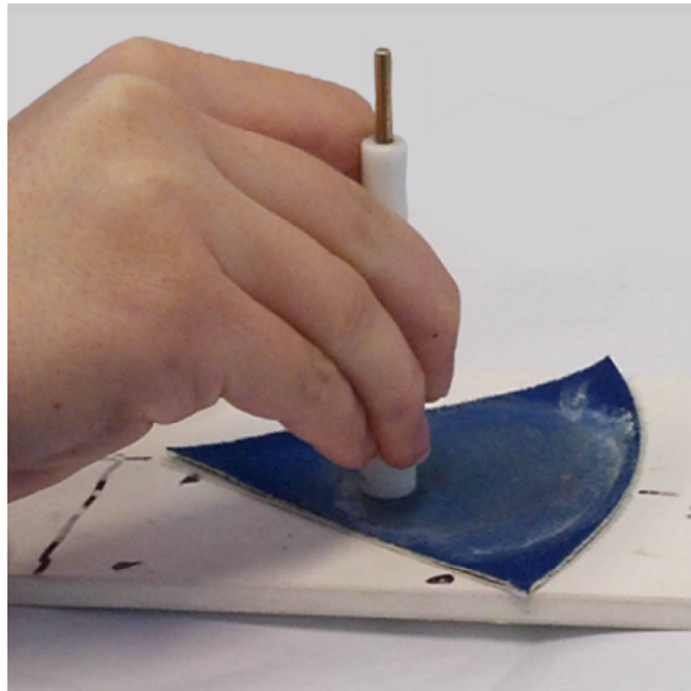


a) Célula eletroquímica com os três eletrodos; b) eletrodo auxiliar, eletrodo de referência e eletrodo de trabalho (eletrodo de carbono vítreo - ECV); c) ECV visto de frente; d) potenciostato/galvanostato  $\mu$ Autolab III<sup>®</sup>.

Fonte: Autoria própria.

Previamente a realização de cada uma das análises, o ECV foi polido com uma suspensão de alumina de 3  $\mu\text{m}$  (Arotec) (Figura 12) e, logo em seguida, foi rinsado com água Milli-Q<sup>®</sup>. O polimento foi feito com o intuito de garantir a reprodutibilidade das análises. Após o tratamento mecânico, os eletrodos foram colocados em solução de KCl (0,5 M; pH 6,5) como eletrólito de suporte para obtenção dos voltamogramas.

**Figura 12:** Polimento do eletrodo de carbono vítreo com suspensão de Alumina 3  $\mu\text{m}$ .



Fonte: Autoria própria.

As condições experimentais estão detalhadas nos Quadros 1, 2 e 3 para a CV, SWV e DPV respectivamente. Todos experimentos foram realizados a temperatura ambiente.

As medidas de pH foram feitas com um pH-metro QUIMIS<sup>®</sup> (Quimis Aparelhos Científicos, São Paulo, Brasil), com um eletrodo de Ag/AgCl KCl 3M.

## **4.2 Análises de vinhos**

### **4.2.1 Amostras**

No presente trabalho foram analisadas um total de cinquenta e dois (52) vinhos de diversas nacionalidades e categorias (Figura 13), sendo trinta (30) vinhos tintos, dez (10) vinhos brancos, quatro (4) vinhos rosê, oito (8) vinhos fortificados sendo eles um (1) vinho Vermouth, um (1) vinho Marsala, três (3) vinhos do porto, dois (2) vinhos madeira e um (1) vinho Jerez, além de uma (1) bagaceira (aguardente de vinho), cinco (5) sucos de uva, sendo dois (2) sucos tipo integral de uva vermelha, um (1) tipo integral de uva verde e dois (2) sucos tipo néctar de uva vermelha.

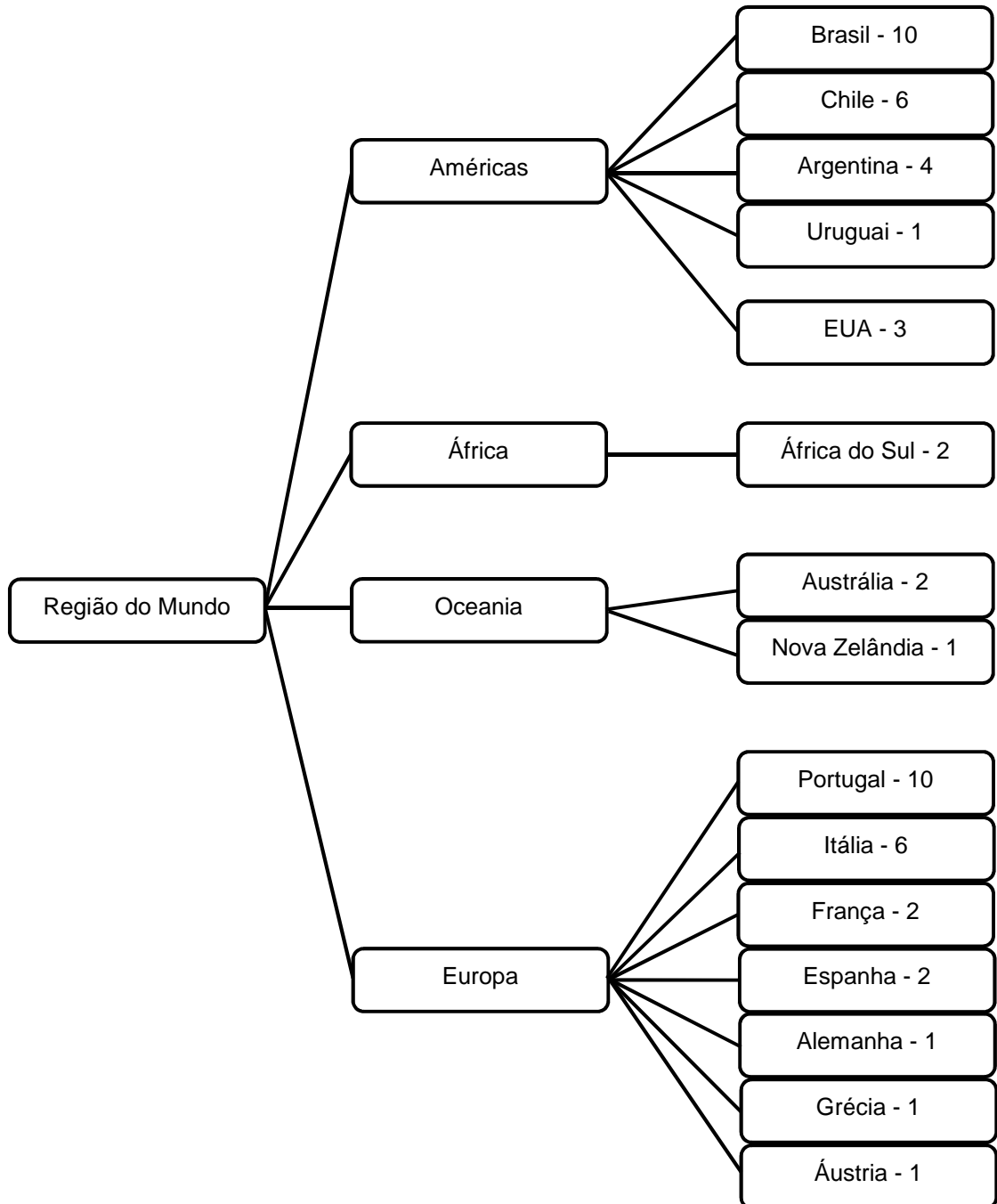
Todas as amostras foram adquiridas no comércio local (supermercados e adegas), em Goiânia - GO. As amostras foram mantidas sob refrigeração a 4°C até o momento da análise.

A escolha das amostras foi feita de forma que pudessem ser analisadas bebidas produzidas em diferentes regiões do mundo e produzidas a partir de diferentes uvas. Dentre os dez (10) maiores países produtores de vinhos, apenas amostras da China não foram analisadas por não terem sido encontradas no mercado local. Por sua vez, a produção nacional foi bem representada por 10 (dez) amostras de diferentes categorias. Os valores das amostras variaram de R\$10,00 a R\$ 80,00.

#### **4.2.1.1 Preparo das amostras**

Os vinhos e sucos foram diluídos em solução tampão de eletrólito de modo a obter uma diluição na proporção 2:3.

**Figura 13:** Nacionalidade dos diferentes vinhos analisados.



## **4.2.2 Análises espectrofotométricas**

### **4.2.2.1 Atividade antirradicalar de DPPH**

A atividade antirradicalar de diferentes vinhos foi determinada com base na habilidade dos extratos em capturarem os radicais DPPH, método que foi descrito por Blois (1958). As análises pelo método de DPPH foram feitas com o espectrofotômetro Q798U2VS (Quimis Aparelhos Científicos, São Paulo, Brasil), em cubetas de vidro de 1 cm, a temperatura ambiente.

Inicialmente, foi preparada uma solução alcoólica de DPPH• cuja concentração foi ajustada para uma absorbância de 0,7 no comprimento de onda de 515 nm. Diferentes volumes de amostra foram diluídos em álcool de forma que o volume final fosse de 3 mL, ao qual foi adicionado 0,5 mL da solução de DPPH•. Essa mistura foi incubada por 30 minutos, a temperatura ambiente e no escuro; em seguida, foi medida a absorbância da solução.

A atividade antioxidante determinada pelo método de DPPH• foi expressa como a quantidade de vinho (amostra) necessária para produzir 50% de descoloração da solução de DPPH• ( $EC_{50}$ ).

## **4.2.3 Análises voltamétricas**

### **4.2.3.1 Equipamentos e acessórios**

Assim como na análise dos fermentados de jabuticaba, as medidas foram feitas em uma célula eletroquímica monocompartimental com três eletrodos. Entretanto, como eletrodo de trabalho foi utilizado o eletrodo de pasta de carbono (EPC -  $\varnothing = 2$  mm).

O EPC foi preparado pela mistura de 70 mg de grafite em pó com 20 mg de óleo mineral na proporção. Previamente a cada análise, o eletrodo foi renovado de forma a garantir a reprodutibilidade das análises.

Na Figura 14, podem ser observados a pasta de carbono utilizada para o preparo do EPC e o eletrodo pronto para o uso. Os eletrodos de referência e auxiliar foram os mesmos descritos em 4.1.4.1.

**Figura 14:** a) Pasta de carbono; b) eletrodo de pasta de carbono.



Fonte: Autoria própria.

As análises foram feitas por DPV e as condições experimentais estão detalhadas no Quadro 4. Todos os experimentos foram realizados a temperatura ambiente.

**Quadro 4:** Parâmetros das análises por voltametria de pulso diferencial das amostras de vinhos:

Parâmetro	Valor
Amplitude de pulso	50 mV
Largura do pulso	0,4 s
Velocidade varredura	5 mV s <sup>-1</sup>

#### 4.2.3.2 Aquisição e apresentação dos dados

A aquisição dos dados foi feita conforme descrito em 4.1.4.2. Durante o tratamento no Origin<sup>®</sup> 8, os voltamogramas foram compilados de acordo com o tipo de bebida, de modo que fosse obtida a média das leituras a fim de que os resultados acerca das análises eletroquímicas sejam o mais confiáveis possível para cada um dos tipos de vinho.

#### 4.2.4 Índice eletroanalítico

Um índice eletroanalítico (EI) foi proposto considerando-se os principais parâmetros voltamétricos, o potencial de pico ( $E_{pa}$ ) e a intensidade de pico ( $I_{pa}$ ).

Considerando-se que, quanto menor o potencial em que ocorre a oxidação, maior é a habilidade de doar elétrons e que, quanto maior a intensidade do pico, maior é a quantidade de espécies eletroativas, o EI foi calculado pela seguinte equação:

$$EI = \frac{I_{pa1}}{E_{pa1}} + \frac{I_{pa2}}{E_{pa2}} + \dots + \frac{I_{pan}}{E_{pan}}$$

em que  $I_{pa}$  e  $E_{pa}$  correspondem a corrente (diretamente proporcional a concentração) e ao potencial (inversamente proporcional a poder redutor) de pico para cada um dos principais picos anódicos observados nos voltamogramas obtidos por DPV.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Análises das bebidas de jabuticaba**

A atividade antioxidante e antirradicalar de bebidas fermentadas de jabuticaba nas variedades tinta, rose e branca e também da aguardente de jabuticaba foram avaliadas por métodos espectrofotométricos e eletroanalíticos.

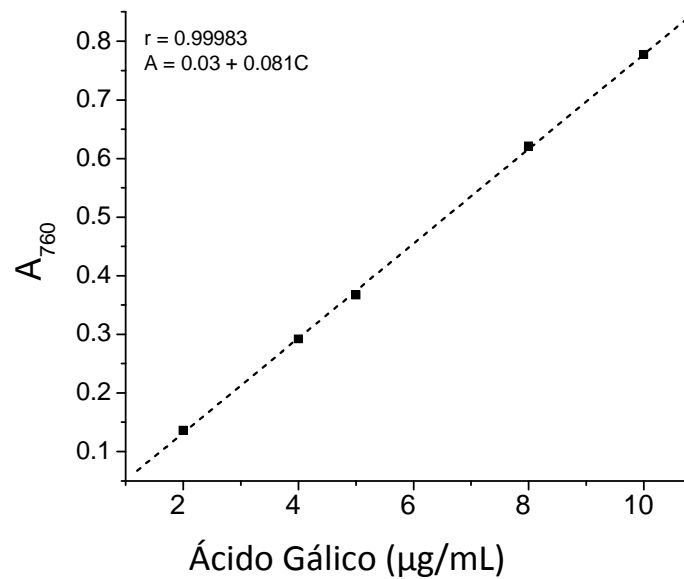
#### **5.1.1 Análises espectrofotométricas**

##### **5.1.1.1 Teor de fenóis totais em bebidas de jabuticaba**

Considerando-se que compostos fenólicos são potentes antioxidantes e que a determinação de fenóis totais é uma abordagem útil para avaliar a capacidade antioxidante de extratos brutos, alimentos e bebidas, foi determinado o teor de fenóis totais em bebidas fermentadas de jabuticaba através do método de Folin-Ciocalteu, conforme ele foi descrito por Georgé, 2005.

Na Figura 15 pode ser observada a curva concentração-resposta da análise pelo método de Folin-Ciocalteu. Os resultados das análises de fenóis totais estão demonstrados na Tabela 2. O maior nível de fenóis dentre as bebidas fermentadas de jabuticaba foi encontrado na bebida tinta ( $1105 \pm 57 \mu\text{g GAE/mL}$ ), enquanto o menor foi encontrado na aguardente ( $19 \pm 2 \mu\text{g GAE/mL}$ ). As bebidas rosê e branca apresentaram teores moderados e similares de compostos fenólicos ( $406 \pm 2,9 \mu\text{g GAE/mL}$  e  $373 \pm 9,6 \mu\text{g GAE/mL}$ , respectivamente).

**Figura 15:** Curva concentração – resposta reagente de Folin-Ciocalteu x ácido gálico.



Absorvância (760 nm) do reagente de Folin-Ciocalteu em função da concentração de solução de ácido gálico (cinco soluções padrão preparadas separadamente).

### 5.1.1.2 Atividade antioxidante avaliada pelo método de captura do radical ABTS<sup>•+</sup>

A potência antioxidante das bebidas fermentadas de jabuticaba foi expressa como Capacidade Antioxidante Total Equivalente ao Trolox (TEAC) e é mostrada na Tabela 2.

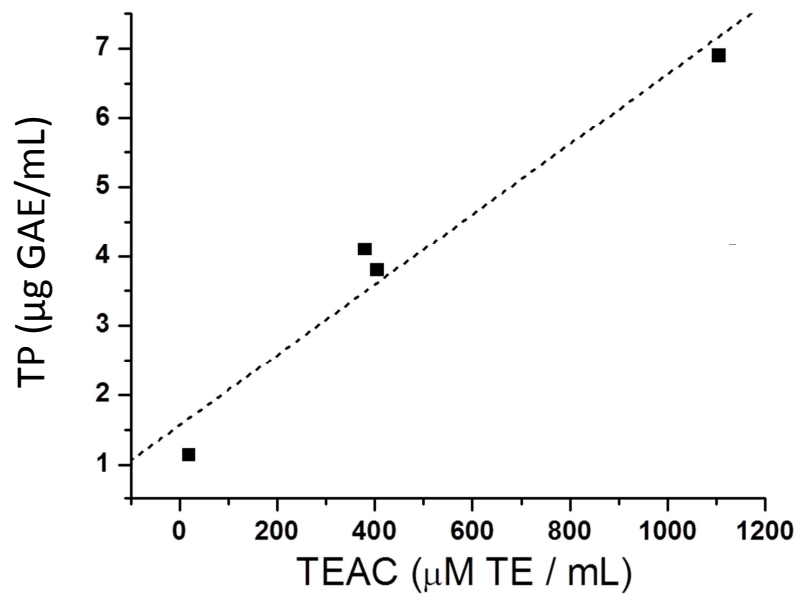
**Tabela 2.** Teor de Fenóis Totais (FT) e TEAC das bebidas feitas a partir da jabuticaba.

	Fermentado tinto	Fermentado rosê	Fermentado branco	Aguardente
FT (µg GAE/ mL)	1105 ± 56,6	405,5 ± 2,9	380,8 ± 9,6	19,1 ± 2,1
TEAC (µmol TE/ mL)	6,9 ± 0,5	3,8 ± 0,14	4,1 ± 0,09	1,14 ± 0,01

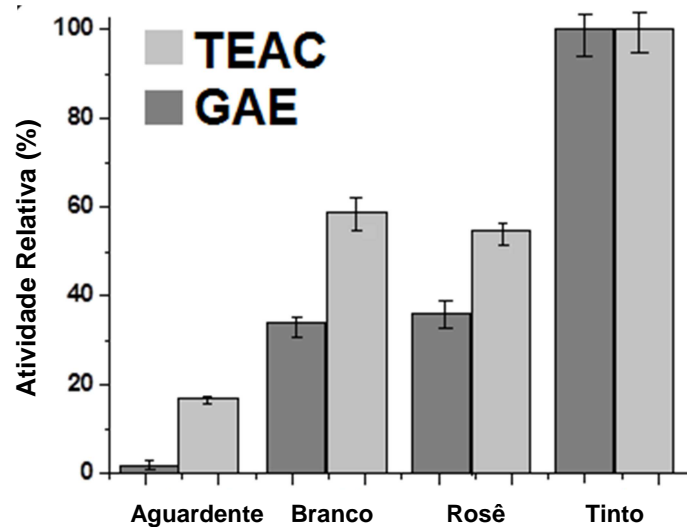
Assim como o teor de fenóis totais, a capacidade antioxidante variou bastante nas quatro diferentes bebidas de jabuticaba analisadas por essa metodologia. Dentre todas, o fermentado tinto foi a que apresentou maior capacidade antioxidante, enquanto a aguardente foi a que apresentou a menor.

Os resultados obtidos se correlacionam bem com o teor de fenóis totais ( $r^2 = 0,977$ ) como pode ser evidenciado pelas Figuras 16 e 17 e são consistentes com outros estudos que demonstram boa correlação linear entre a capacidade antioxidante e o teor de fenóis totais (Cai, 2004).

**Figura 16:** Relação entre a capacidade antioxidante (análise pelo método ABTS) e o teor de fenóis totais (análise pelo método de Folin-Ciocalteu) das quatro bebidas de jabuticaba.



**Figura 17:** Relação entre a capacidade antioxidante (análise pelo método ABTS) e o teor de fenóis totais (análise pelo método de Folin-Ciocalteu) das quatro bebidas de jabuticaba.



### 5.1.2 Análises voltamétricas

Considerando-se a natureza eletroativa que os compostos antioxidantes apresentam, os métodos eletroanalíticos representam métodos adequados e indicados para estudos de tais compostos (Makhotkina; Kilmartin, 2010). No caso de amostras complexas, como fitoterápicos, comidas e bebidas, por exemplo, a complexidade inerente a essas amostras dificultam a exatidão da caracterização eletroquímica dos compostos majoritários. Entretanto, ainda assim é possível desenvolver métodos adequados para determinar o teor de fenóis totais e também estimar o poder antioxidante dessas amostras.

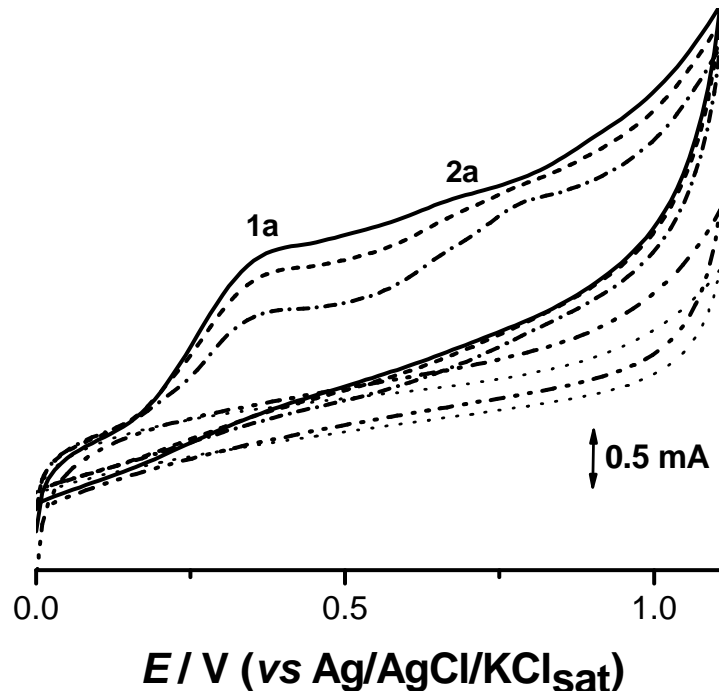
#### 5.1.2.1 Voltametria cíclica (CV)

As análises por voltametria cíclica podem ser úteis para avaliar o comportamento redox dos antioxidantes. O perfil voltamétrico pode fornecer informações sobre a reversibilidade, a cinética, o mecanismo de transferência de prótons e cargas assim como informações sobre o envolvimento de reações químicas acopladas (Reis *et al*, 2009). Essas informações podem oferecer um entendimento exato sobre a atividade antioxidante esperada.

Uma análise completa dos voltamogramas começa pelos dois principais parâmetros eletroquímicos, a intensidade dos picos de oxidação ( $I_p$ ) e o potencial ( $E_p$ ) em que ocorre a reação de oxidação e, conseqüentemente, o pico. Para esse parâmetro, a correlação feita se baseia no fato de que quanto menor o potencial de oxidação, maior a habilidade de doar elétrons. Já para o primeiro parâmetro, a correlação se baseia no fato de que quanto maior é a intensidade da corrente maior é o número de elétrons transferidos. De acordo com Lei de Faraday, a intensidade do pico pode ser facilmente correlacionada com a concentração de espécies eletroativas. Em outras palavras, quanto maior os níveis de corrente, maior é a concentração de espécies eletroativas na amostra. Por outro lado, a capacidade de transferir elétrons representa a atividade antioxidante esperada (Reis *et al*, 2009, Jorgensen, 1999).

Na Figura 18 são mostrados os voltamogramas cíclicos obtidos com ECV para as diferentes bebidas alcoólicas produzidas a partir da jabuticaba.

**Figura 18:** Voltamogramas obtidos por voltametria cíclica a partir das diferentes bebidas de jabuticaba.



Voltamogramas obtidos por CV em solução de tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0 com 5% v/v de amostra,  $a_v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ . Bebida fermentada tinta de jabuticaba (—); bebida fermentada rosê de jabuticaba (- - -); bebida fermentada branca de jabuticaba (- · - ·); aguardente de jabuticaba (- · · ·) e tampão fosfato (.....).

À partir dos voltamogramas cíclicos da Figura 18 é possível observar claramente que as bebidas fermentadas de jabuticaba apresentaram picos de corrente mais intensos que a branca e a rosê. É evidente, também, que o perfil voltamétrico apresentado pela aguardente é quase idêntico ao do branco, representado pela solução tampão. Esses resultados são compatíveis com o fato de que, no preparo da bebida tinta, a casca é utilizada, enquanto nas outras, a casca é retirada (Roussis *et al*, 2008).

Já no processo de produção das aguardentes, bem como de outras bebidas destiladas, os polifenóis são naturalmente removidos, de modo que o baixo teor de antioxidantes encontrado pelo método eletroanalítico corresponde ao esperado para essa bebida (Alonso *et al*, 2004).

### 5.1.2.2 Voltametria de pulso diferencial (DPV)

Com o objetivo de melhor avaliar o processo de oxirredução, foi utilizada também a DPV para avaliação dos vinhos.

Na técnica de DPV, a forma de amostragem da corrente possibilita a minimização da corrente capacitiva, promovendo uma melhora na sensibilidade do método e também na resolução dos picos. Dessa maneira, a DPV permite a observação de picos que não podem ser visualizados na CV.

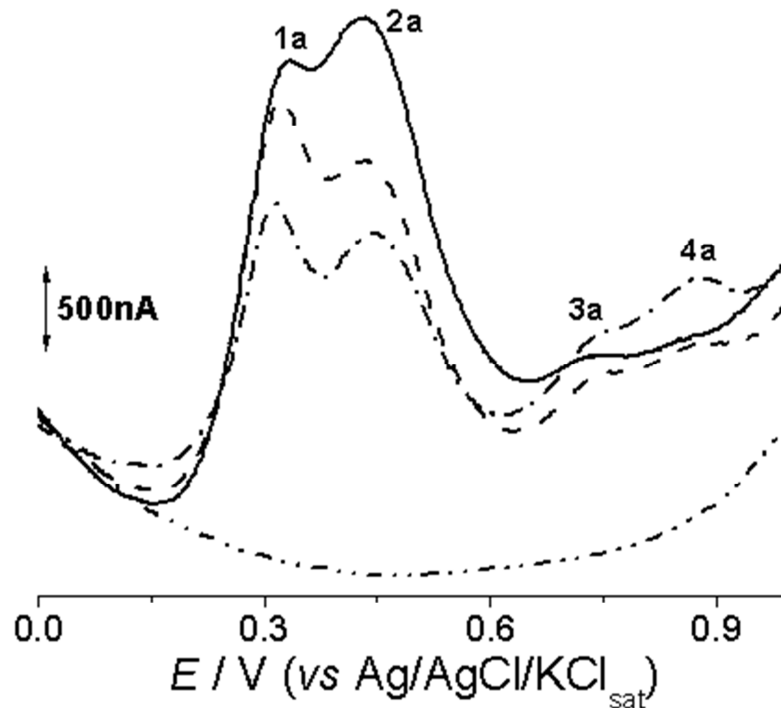
Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 5,0 para bebidas alcoólicas de jabuticaba são apresentados na Figura 19. A partir deles, é possível observar quatro picos de oxidação consecutivos: pico 1a em  $E_{p1a} \cong + 0,32$  V, pico 2a em  $E_{p2a} \cong + 0,43$  V, pico 3a em  $E_{p3a} \cong + 0,74$  V e pico 4a em  $E_{p4a} \cong + 0,89$  V. Já para a aguardente, não foi observado qualquer pico, mesmo em concentrações altas de amostra (50% v/v).

No caso do fermentado tinto, foram observados três picos bem definidos, sendo eles o pico 1a, em  $E_{p1a} \cong + 0,38$  V, pico 2a, em  $E_{p2a} \cong + 0,55$  V e o pico 3a em  $E_{p3a} \cong + 0,80$  V.

Apesar de não ser possível estabelecer qual composto é responsável por cada pico anódico, é possível que sejam feitas suposições. Os picos com potencial anódico inferior a 0,5 V obtidos em pH levemente ácido são consistentes com compostos fenólicos que apresentam porção catecólica, enquanto que os picos em potencial de aproximadamente 0,7 V podem ser atribuídos ao grupamento resorcinol. Já os picos em potencial acima de 0,8 V podem ser atribuídos a monofenóis (Enache; Oliveira-Brett, 2011).

O grande número de picos é indicativo não apenas da presença de polifenóis, mas também de que esses polifenóis podem apresentar um padrão diferente de substituição, que está de acordo com a natureza complexa dessas amostras (Gil; Enache; Oliveira-Brett, 2012).

**Figura 19:** Voltamogramas obtido por voltametria de pulso diferencial a partir das bebidas de jabuticaba.



DPV feita solução de tampão fosfato 0,1 M, pH 5,0 como solução eletrolítica com 5% v/v de amostra de fermentados de jabuticaba. Amplitude do pulso de 50 mV e taxa de scan de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ . Fermentado tinto de jabuticaba (—); fermentado rose de jabuticaba (- - -); fermentado branco de jabuticaba (- · -); aguardente de jabuticaba (- · · -).

É interessante observar, também, que apesar da diferença bastante evidente nos níveis de corrente, todas as bebidas fermentadas de jabuticaba apresentam perfil semelhante. A Tabela 3 apresenta os picos de corrente obtidos para os três fermentados e a aguardente de jabuticaba e também de um vinho tinto para comparação.

**Tabela 3:** Corrente para o pico anódico ( $I_{pa}$ ) obtida em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 5,0 com 5% v/v de diferentes bebidas de jabuticaba e vinho tinto.

Amostra	$I_{p1a}$ ( $\mu\text{A}$ )	$I_{p2a}$ ( $\mu\text{A}$ )	$I_{p3a}$ ( $\mu\text{A}$ )	$I_{p4a}$ ( $\mu\text{A}$ )
Aguardente	0	0	0	0
Fermentado Branco	4,0	3,6	3,0	3,4
Fermentado Rose	4,5	4,3	2,9	3,1
Fermentado Tinto	5,0	5,3	3,5	3,2
Vinho Tinto	4,8	5,5	3,4	-

(n = 3), CV < 5%

Exceto pela aguardente, todas as amostras demonstraram a presença de um grande número de compostos eletroativos, como demonstrado na Tabela 3. A ausência de picos na aguardente é consistente com seu processo de produção visto que a destilação é capaz de remover os compostos fenólicos potencialmente presentes (Schwarz *et al*, 2009). Em razão da ausência de espécies eletroativas na aguardente de jabuticaba, não foram feitos mais testes com essa bebida.

Considerando-se que os picos de potencial  $E_{pa}$  obtidos para todos os fermentados de jabuticaba foram bastante semelhantes, pode ser inferido que os compostos majoritários presentes em todas as amostras apresentam a mesma natureza eletroativa. Por outro lado, a avaliação comparativa da natureza antioxidante deve levar em conta também a intensidade do pico de corrente ( $I_{pa}$ ).

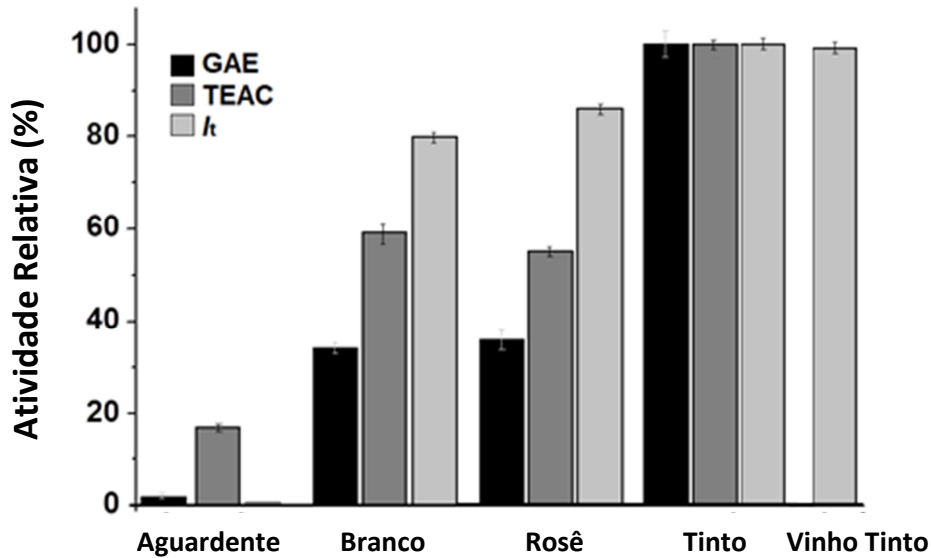
Compostos radicalares, quando em pH fisiológico, costumam ser reduzidos em potenciais menores ou iguais a 0,8 V. Dessa maneira, os compostos responsáveis pelos picos 1a e 2a ( $E_{pa} < 0,5$  V), assim como os compostos que deram origem ao pico 3a ( $E_{pa} \sim 0,7$  V) serão capazes de exercer atividade antiradicalar em organismos vivos. Além disso, compostos eletroativos que apresentam potenciais anódicos menores ( $< 0,4$  V) apresentam força capaz de restaurar antioxidantes endógenos como é o caso do ácido ascórbico e do tocoferol, que apresentam potencial anódico em torno de 0,45 V (Jorgensen, 1999; Gil; Enache; Oliveira-Brett, 2012). Sendo assim, a capacidade de varrer radicais livres de um composto fenólico pode estar relacionada com picos de corrente que ocorrem em potenciais inferiores a 0,7 V, sendo ótima quando inferior a 0,45 V. Um bom exemplo, é a rutina (vitamina PP) que apresenta tal perfil eletroquímico ( $E_{pa} < 0,4$  V, pH 7,0) e têm como funções a de eliminar radicais livres e restaurar a vitamina C (Penteado, 2005).

Na Figura 20, pode ser observada a atividade antioxidante relativa determinada por três diferentes metodologias para as quatro bebidas alcoólicas produzidas a partir da jabuticaba. Para efeito de comparação, foi analisado também um vinho tinto seco.

Correspondendo ao esperado, a bebida tinta produzida a partir da jabuticaba apresentou atividade antioxidante maior que os fermentados branco e rosê. Além disso, quando comparado com um vinho tinto, a atividade antioxidante mostrou ser

ligeiramente mais elevada, o que destaca o grande potencial da jabuticaba como fonte de antioxidantes naturais.

**Figura 20:** Atividade antioxidante relativa determinada por diferentes métodos.



Resultados obtidos por diferentes metodologias de avaliação da atividade antioxidante. Equivalente de ácido gálico (GAE), capacidade antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) e corrente total obtida para os picos 1a e 2a (I).

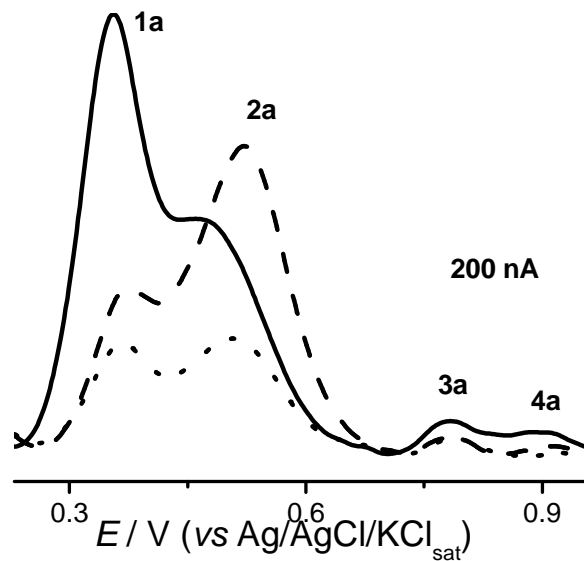
No entanto, pode ser claramente observado que, apesar da boa correlação, cada método apresenta um perfil distinto, o que pode ser explicado pelo fato de os métodos apresentarem princípios diferentes, bem como pelas limitações inerentes a cada ensaio diferente.

Dentre as principais limitações dos ensaios eletroquímicos, pode-se destacar a adsorção de produtos de oxidação na superfície do eletrodo como a mais importante. O processo adsortivo que ocorre durante a oxidação eletroquímica leva à formação de um filme isolante que, por sua vez, diminui a superfície do eletrodo disponível para os processos de oxirredução, o que pode conduzir a importantes erros de interpretação.

Dessa maneira, as correntes de pico podem ser muito menores do que o esperado, caso o procedimento de limpeza da superfície do eletrodo (polimento) não seja suficiente para remover o filme isolante formado.

Na Figura 21, podem ser observados os voltamogramas referentes à análises sucessivas feitas na mesma solução, sem que a superfície do EPC fosse polida e o decaimento da intensidade dos picos demonstraram a ocorrência do fenômeno de passivação. Além disso, foi observado que o processo de adsorção pode ocorrer também entre as etapas 1a e 2a de oxidação, afetando os picos 3a e 4a.

**Figura 21:** Análises sucessivas de fermentado branco.



Voltamogramas corrigidos em relação a linha de base obtido por DPV em análises sucessivas em KCl 0,5 M, pH 6,5, com 2,5 % v/v de fermentado branco: primeiro (—), segundo (- - -) e terceiro (....) scan. Amplitude de pulso de 50 mV, taxa de scan de 5 mV s<sup>-1</sup>.

O mesmo perfil foi observado para os DPV's das bebidas tinta e rosê, entretanto, devido à maior quantidade e variedade de compostos fenólicos na primeira, o comportamento de adsorção foi maior, conduzindo a um bloqueio da superfície do eletrodo mais rapidamente que no fermentado rosê.

Por outro lado, tal comportamento de adsorção é típico para a oxidação eletroquímica de compostos fenólicos, reforçando, assim, a potencialidade das técnicas de eletroanálise como ferramentas de identificação de compostos fenólicos, mesmo para análise de amostras complexas (Gil; Enache; Oliveira-Brett, 2012).

O comportamento redox dos compostos orgânicos é sempre dependente das condições de pH, sendo que o processo de adsorção é, muitas vezes, mais baixo

em meio alcalino. Para avaliar a influência do pH sobre o comportamento de oxirredução, as bebidas fermentadas foram também estudadas sobre uma ampla faixa de pH (entre 2 e 11) através de DPV.

Na Figura 22 são mostrados os gráficos 3D do  $E_{pa}$  vs pH obtidos para fermentados branco e tinto.

Verificou-se que os potenciais dos picos anódicos deslocaram linearmente para valores menos positivos com o aumento de pH, indicando que eles foram gradualmente desprotonando e, também, que a oxidação é independente do pH (Figuras 22 A e B). A quebra das curvas pH vs  $E_{pa}$  no pH próximo a 7,0, observado na parte direita das Figuras 22 A e B, indicam um valor de pKa entre a neutralidade e pH ligeiramente alcalino para os compostos fenólicos principais presentes nas amostras (Janeiro; Oliveira-Brett, 2004).

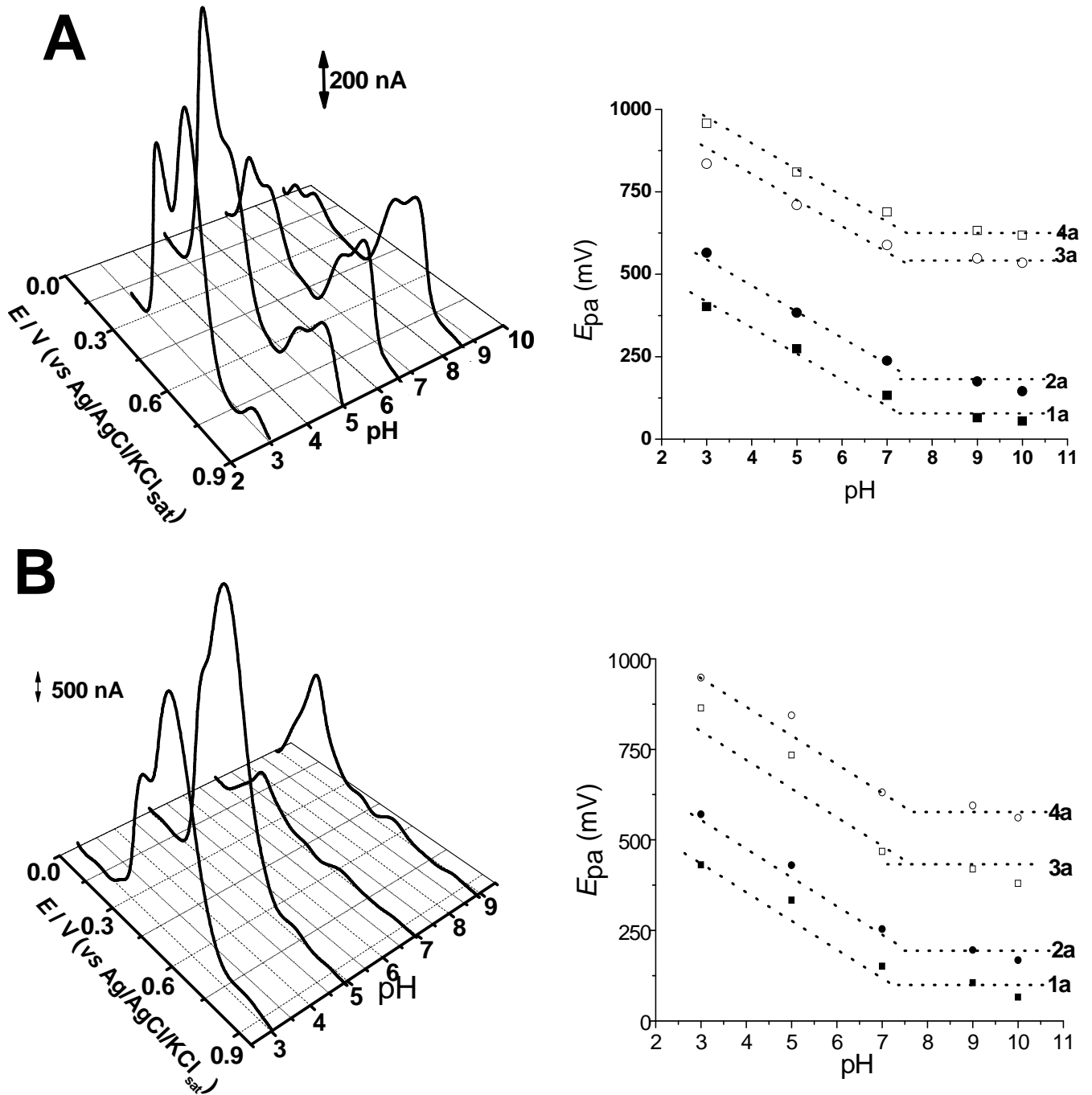
No entanto, o aumento da corrente dos picos 3a e 4a pode estar associado com a diminuição do processo de adsorção relacionado aos picos 1a e 2a em pH mais elevado. Assim, o processo de adsorção em menor grau quando em meio alcalino foi confirmado.

### 5.1.2.3 Voltametria de onda quadrada (SWV)

Dentre as principais vantagens da SWV em relação às demais técnicas voltamétricas pode-se citar a sua maior velocidade de análise e menor consumo das espécies eletroativas. Sendo assim, quando comparado com a DPV, a SWV diminui os problemas relacionados ao envenenamento da superfície do eletrodo. Outra vantagem desta técnica é o fato de que ela possibilita a verificação da reversibilidade de cada processo de oxirredução (Diculescu *et al*, 2012).

Na SWV a corrente é amostrada em ambos os processos, positivo e negativo, e, dessa maneira, à oxidação e redução das espécies eletroativas na superfície do eletrodo podem ser estudadas em um mesmo experimento, o que permite analisar a reversibilidade das reações de transferência de elétrons (Gil; Enache; Oliveira-Brett, 2012).

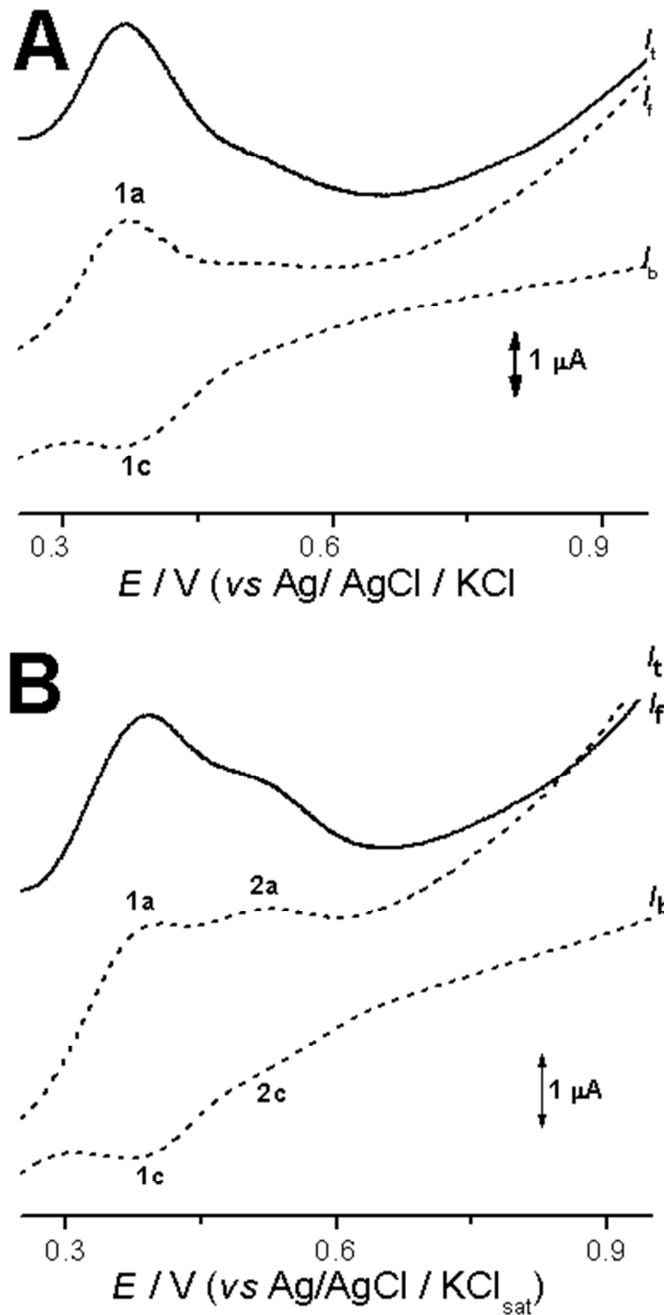
Figura 22: Gráfico 3D pH x  $E_{pa}$  gráfico e  $E_{pa}$  vs. pH.



Gráficos 3D obtidos através da plotagem dos voltamogramas obtidos por DPV e corrigidos em relação a linha base e gráfico  $E_{pa}$  vs. pH de soluções de 5% v/v em tampão fosfato: (a) fermentado branco (b) fermentado rosê. A linha pontilhada corresponde a 60 mV por unidade de pH. Taxa de scan de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ .

Os voltamogramas de onda quadrada foram gravados com uma frequência de 20 Hz, em KCl 0,5 M, pH 6,5, utilizando-se sempre uma superfície de ECV recém polida (Figura 23).

**Figura 23:** Voltamogramas obtidos por SWV para os fermentados tinto e branco de jabuticaba.



Voltamogramas obtidos por SWV em solução tampão de KCl 0,5 M, pH 6,5 como solução eletrolítica com 1,5% v/v de: (A) fermentado branco e (B) fermentado tinto;  $I_t$  – total,  $I_c$  – catódico e  $I_a$  – anódico,  $f = 20$  Hz,  $\Delta E_s = 1$  mV,  $v_{eff} = 20$  mVs<sup>-1</sup>.

Quando plotados os voltamogramas relativos ao sentido direto ou anódico ( $I_f$ ) e reverso ou catódico ( $I_b$ ), representados na Figura 23 por linhas tracejadas, podem ser observados valores idênticos de corrente para processos de oxidação e de redução. Tal perfil indica que as espécies envolvidas neste processo redox apresentam comportamento reversível, fato que somado ao baixo potencial de pico ( $E_{pa} \sim -0.4$ , pH 6), sugere envolvimento de flavonoides contendo grupo catecol no anel B, os quais são reconhecidos pelo excelente poder antioxidante.

Por outro lado, uma vez que o método SWV apresenta maior sensibilidade aos processos reversíveis, os ensaios SWV são geralmente realizados em intervalos de concentração mais baixos, o que pode explicar a ausência de picos irreversíveis, tais como picos 3a e 4a.

## **5.2 Vinhos de diferentes origens.**

A atividade antioxidante de vinhos produzidos em diversas regiões do mundo, a partir de uvas variadas, bem como de sucos de uva foi avaliada por métodos espectrofotométricos e eletroanalíticos.

### **5.2.1 Determinação da capacidade antioxidante por meio do método DPPH e Índice Eletroanalítico.**

A Tabela 4 apresenta os valores de  $EC_{50}$  e EI obtidos para os vinhos analisados. Com o objetivo de verificar alguns fatores que poderiam influenciar no poder antioxidante dos vinhos bem como nos benefícios à saúde relacionados com seu consumo, a escolha das amostras foi efetuada com cuidado. Foram escolhidas amostras das principais categorias de vinho (tinto, branco, rosê, espumante, vinho do porto etc) tendo em conta as variedades de uva usadas na produção do vinho, a região de origem e os parâmetros de qualidade.

Tabela 4: EC<sub>50</sub> e índice eletroanalítico para as diferentes amostras de vinho analisadas.

<sup>a</sup> Região	<sup>b</sup> Categoria	<sup>c</sup> Variedades das Uvas	EC <sub>50</sub> (μL)	IE (μA/mV)	Códigos para Classificação
1. ARG	T	Mb	21,8	35,1	<b>Região/Nacionalidade:</b> <b>América do Sul:</b> Argentina (ARG), Brasil (BRA), Chile (CHI), Uruguai (URU). <b>América do Norte:</b> Estados Unidos (EUA). <b>África:</b> África do Sul (AFS). <b>Oceania:</b> Austrália (AUS), Nova Zelândia (NZL). <b>Europa:</b> Áustria (AUT), França (FRA), Alemanha (ALE), Grécia (GRE), Itália (ITA), Portugal (PTG), Espanha (ESP). <b>Categoria do Vinho<sup>b</sup>:</b> - Tinto (T); rosê (r); branco (B); doce (d); mesa (m); artesanal (a); Fortificado (F); Vinho do Porto (VP); Vinho Madeira (VM); Vinho Marsala (ms); Jerez "Xerez" (xe); Vermouth (vm); "Vinho Verde" (vv); Frisante (f). <b>Variedades das Uvas<sup>c</sup>:</b> <b>Uvas Roxas-</b> Agiorghitiko (Ag); Barbera (Ba); Cabernet Sauvignon (Cs); Carmenere (Ca); Isabella (Is); Malbec (Mb); Merlot (Me); Periquita (Pe); Pinotage (Pg); Pinot Noir (Pn); Syrah (Sy); Tannat (Ta); Tempranillo (Te); Tinta Cão (Tc); Tinta Roriz (Tr); Touriga Nacional (Tn); Touriga Franca (Tf); Trincadeira (Td); Zweigelt (Zw). <b>Uvas Verdes-</b> Barcelo (Bc); Catarratto (Ct); Chardonnay (Ch); Clairette blanche (Cb); Grillo (Gr); Inzolia (In); Lorena (Lo); Malvasia (Mv); Moscatel (Mo); Niagara (Ni); Riesling (Ri); Roupeiro (Ro); Palomino (Pa); Pedro Ximenez (Px); Piquepoul (Pq); Trebbiano (Tb). Outras uvas locais (ovl).
2. ARG	T-m	Mb:ovl	26,4	27,7	
3. ARG	T-m	Mb:ovl	22,1	33,8	
4. ARG	B	Ch	74,8	20,0	
5. BRA	f-d-B	ovl	290,8	8,8	
6. BRA	B	Ni:Lo	56,4	17,9	
7. BRA	B-m	Ni:Lo	132,0	16,9	
8. BRA	r-m	Ni:ls	80,6	18,9	
9. BRA	T-m	Is:ovl	20,6	33,9	
10. BRA	T-a	Is:ovl	23,8	34,9	
11. BRA	T-d	Me:Cs	25,0	21,1	
12. BRA	T-m-d	ovl	38,1	19,8	
13. BRA	T	Me	22,9	27,6	
14. BRA	T	Ta	16,2	28,9	
15. CHI	T-d	ovl	74,6	19,9	
16. CHI	T	Cs	15,5	43,5	
17. CHI	T	Me	19,1	28,3	
18. CHI	T	Cs:Me	17,1	33,5	
19. CHI	T	Ca	14,8	46,1	
20. CHI	B	Ri	57,6	20,2	
21. URU	T	Ta	15,9	36,4	
22. EUA	B	Ch	64,4	15,8	
23. EUA	T	Me	26,9	25,7	
24. EUA	T	Sy	22,5	27,5	
25. AUT	T	Zw	15,3	29,8	
26. ALE	B	Ri:ovl	204,9	8,5	
27. FRA	T	Cs	16,9	27,0	
28. FRA	r	Sy:ovl	68,7	21,2	
29. GRE	T	Ag	18,5	27,3	
30. ITA	T	Ba:ovl	20,8	32,3	
31. ITA	f-B	Mo:ovl	95,1	15,0	
32. ITA	f-B	Mo:ovl	96,5	14,2	
33. ITA	f-r	Ba:Mo:ovl	78,6	15,8	
34. ITA	F-vm	Ct:Tb:Cb:Pq	304,1	10,6	
35. ITA	F-ms	Ct:Gr:In	104,2	14,0	
36. PTG	f-B-vv	Bc	118,1	16,5	
37. PTG	r	Te:ovl	92,6	17,8	
38. PTG	T	Tf:Tr:Tn:ovl	18,6	24,7	
39. PTG	T	Tr:Tn:Pe	18,1	27,4	
40. PTG	T	Sy:Te:Tn	17,5	28,3	
41. PTG	F-VP	Tc:Tn:Tr:ovl	101,1	11,0	
42. PTG	F-VP	Tc:Tn:Tr	90,6	15,5	
43. PTG	F-VP	Tc:Tn:Tr:ovl	96,9	12,3	
44. PTG	F-VM	Mv:ovl	116,8	7,5	
45. PTG	F-VM	Mv:ovl	105,9	8,3	
46. ESP	T	Te	20,1	24,3	
47. ESP	F-xe	Pa:Px:Mo	255,1	10,8	
48. AFS	T	Pg	19,5	31,5	
49. AFS	T	Sy	18,9	34,0	
50. AUS	T	Sy	23,9	29,2	
51. AUS	T	Pg	22,1	33,8	
52. NZL	T	Pn	20,4	31,1	

Nota: EC<sub>50</sub> para 1 M de Ácido Gálico corresponde a 11,5 μL

A primeira observação que pode ser tomada a partir dessa tabela é que os vinhos tintos apresentaram maior capacidade antioxidante do que os brancos, o que está de acordo com os resultados esperados (Roussis *et al*, 2008; Gorinstein; Caspi; Zemser, 2000).

O EC<sub>50</sub> médio para os vinhos tintos e brancos secos foram, respectivamente, de 20,1 mL (n = 27) e 98,4 µL (n = 6) (Tabela 5). Na verdade, o pior (mais alto) EC<sub>50</sub> entre vinhos tintos secos, 26,9 mL, foi ainda menor que 56,4 mL, que representa o melhor valor de EC<sub>50</sub> entre os vinhos brancos aqui estudados. No que diz respeito à atividade antiradicalar do DPPH, pode-se observar que os vinhos tintos apresentam cerca de cinco vezes mais compostos antioxidantes que os vinhos brancos.

Por sua vez, não houve diferença estatisticamente significativa entre as diferentes variedades de uva usadas na produção dos vinhos, bem como entre diferentes regiões produtoras de vinho.

Por outro lado, as características de processamento de alguns tipos específicos de vinhos demonstraram exercer uma influência importante sobre o teor de compostos fenólicos e, como consequência, sobre o poder antioxidante final.

**Tabela 5:** EC<sub>50</sub> médio de diferentes grupos de amostras.

<b>Amostra</b>	<b>EC<sub>50</sub> médio (µL)</b>
Vinhos tintos:	20.1 µL (n = 27)
Vinhos brancos:	98.4 µL (n = 6)
Vinhos rosê	80.6 µL (n = 3)
Vinhos espumantes	134.9 µL (n = 5)
Vinhos tintos doces	45.9 µL (n = 3)
Vinhos Fortificados	146.8 µL (n = 8)

Os vinhos fortificados como, por exemplo, o porto, o madeira, o jerez, o Vermouth, o Commandaria e vinhos do tipo Marsala, bem como os vinhos gaseificados, como os espumante, o verde e o frisante, também podem apresentar valores mais elevados EC<sub>50</sub>. Sendo assim, conclui-se que a adição de aguardente e açúcar podem exercer um efeito de diluição e, além disso, talvez, a oxidação natural que ocorre durante o processo de envelhecimento pode explicar a menor atividade antiradicalar obtida para os oito vinhos fortificados (Porto, Madeira, Jerez e Vermouth) aqui avaliados.

No caso de vinhos espumantes, os valores mais elevados de  $EC_{50}$  quando comparados com os seus análogos de branco e rosê pode ser também relacionados com o efeito de diluição exercido pelas bolhas. Os valores médios obtidos para os vinhos brancos e rosê foram de 98,4 mL (n = 6) e 80,6 mL (n = 3), respectivamente e são mais baixos do que a média global de 134,9 mL (n = 5) obtidos para os vinhos espumantes.

Embora os vinhos de mesa tenham apresentado valor médio de  $EC_{50}$  menor que os análogos de maior valor comercial, o nível de qualidade foi melhor evidenciado quando vinhos tintos secos foram comparados aos doces. Os vinhos tintos doces apresentam um valor médio de  $EC_{50}$  de 45,9  $\mu$ L (n = 3), o que representa mais do que duas vezes o valor observado para os vinhos tintos secos.

Por sua vez, observou-se também que os vinhos tintos apresentam atividade antioxidante mais elevada do que os sucos (Tabela 6), demonstrando que o processo global de fabricação dos vinhos promove uma extração dos fenóis presentes na casca da uva superior ao processo de produção dos sucos.

**Tabela 6:** Capacidade antioxidante de sucos de uva brasileiros.

<b>Amostra</b>	<b><math>EC_{50}</math> (<math>\mu</math>L)</b>	<b>IE (<math>\mu</math>A/mV)</b>
<b>Suco integral de uva vermelha 1</b>	37,0	15,9
<b>Suco integral de uva verde</b>	31,1	12,1
<b>Suco integral de uva vermelha 2</b>	25,0	18,3
<b>Suco de uva do tipo néctar 1</b>	44,5	7,5
<b>Suco de uva do tipo néctar 2</b>	45,2	8,5

Além disso, como esperado, o suco de uva integral apresentou maior atividade antioxidante do que o suco de uva do tipo néctar, ambos comumente encontrado em supermercados. Na verdade, os sucos naturais integrais têm maior teor de polpa que sucos do tipo néctar. Embora os açúcares sejam geralmente reconhecidos como agentes redutores fracos, tal propriedade é irrelevante frente ao forte caráter doador de elétrons dos compostos fenólicos. Portanto, a maior quantidade de açúcar no suco tipo néctar ou no vinho doce não exerce grande influência positiva sobre a atividade antiradicalar dos vinhos.

### 5.2.2 Índice Eletroanalítico

Como já foi dito anteriormente, devido ao fato de os antioxidantes serem compostos eletroativos, a eletroanálise representa uma ferramenta útil para a avaliação deles. Bons agentes doadores de elétrons podem oxidar reversivelmente em potenciais de pico inferiores ( $E_{pa} < 0,5$  mV, pH 7). Seguindo esta ideia, o conceito de Índice Electroquímico já foi anteriormente proposto para qualificar os compostos puros (Blasco; González; Escarpa, 2004).

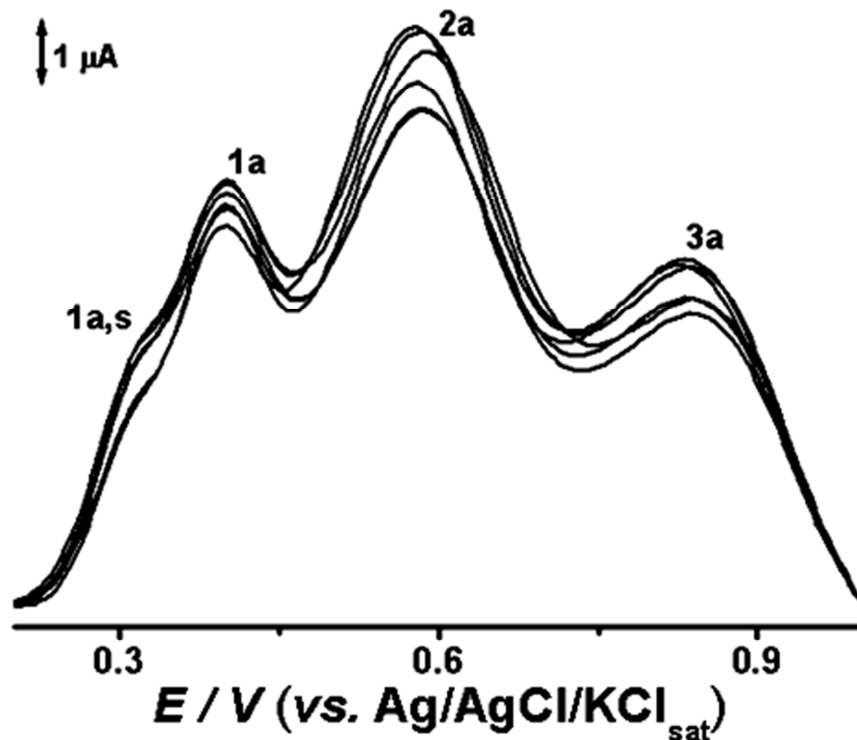
Além da informação direta de que os potenciais de pico podem fornecer sobre o poder redutor, a corrente de pico ( $I_{pa}$ ), outro parâmetro eletroquímico, também pode ser muito útil. De acordo com a Lei de Faraday, em que a quantidade de espécies eletroativas pode ser estequiometricamente correlacionada com as quantidades de elétrons transferidos, a intensidade do pico de corrente pode dar uma ideia da concentração de antioxidantes (Zou *et al*, 2002).

A formação de um filme isolante na superfície do ECV, comum nos processos de oxidação eletroquímica de compostos fenólicos, pode comprometer a repetibilidade de análises quantitativas desses compostos. Com base nesse fato, optou-se por utilizar EPC nas determinações eletroanalíticas por DPV dos diversos vinhos a fim de minimizar o comprometimento da superfície do eletrodo devido ao forte processo de adsorção que ele pode sofrer.

A Figura 24 mostra seis voltamogramas obtidos por DPV a partir da mesma amostra de vinho tinto, sendo que em cada ensaio um eletrodo de pasta de carbono diferente foi empregado.

O perfil voltamétrico de variedades diferentes de vinhos mostrou algumas características típicas. Foi observado nos experimentos que os vinhos tintos apresentam um ombro  $1a,s$  em  $E_{p1a,s} \sim 0,3$  V, além de três picos anódicos bem definidos, sendo eles  $1a$ ,  $2a$  e  $3a$  nos potenciais de aproximadamente 0,37; 0,57 e 0,80 respectivamente. Por sua vez, os vinhos brancos apresentaram basicamente dois picos bem definidos,  $1a$  e  $3a$ , em  $E_{p1a} \sim 0,37$  V e  $E_{p3a} \sim 0,83$  V. Já o vinho rosê demonstrou um perfil intermediário apresentando um pico  $2a$  menos intenso.

**Figura 24:** Repetibilidade da análise da mesma amostra por diferentes EPC.

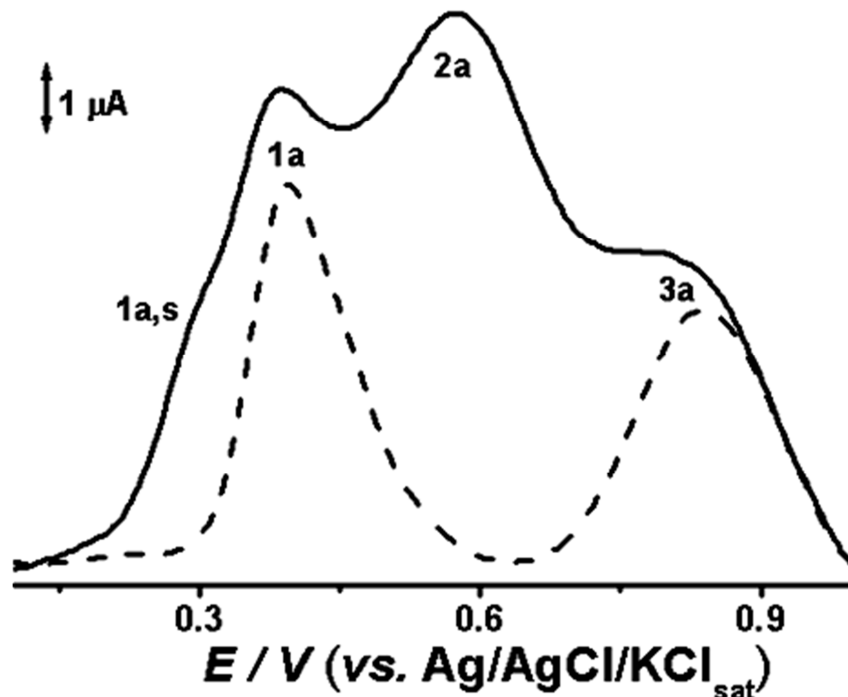


Voltamogramas obtidos por DPV a partir de 2 mL de vinho tinto em 3 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 5,0 utilizando-se seis diferentes EPC ( $\varnothing = 2$  mm). Largura do pulso: 5 mV; amplitude de pulso: 50 mV, taxa de scan:  $5 \text{ mV s}^{-1}$ .

Na Figura 25 são representados os voltamogramas simulados com a média para todos os vinhos tintos e média dos vinhos brancos aqui estudados. Os cálculos foram feitos pelo software Origin<sup>®</sup> 8.

Apesar de pequenas variações de resolução, tais como o aparecimento de ombros e desdobramentos, o padrão de dois ou três picos principais para os vinhos brancos e tintos, respectivamente, foi semelhante a uma impressão digital dos vinhos. Alguns dos mais distintos perfis DPV voltamogramas são mostrados na Figura 26.

**Figura 25:** Voltamogramas médios obtidos por DPV para vinhos tintos e brancos.

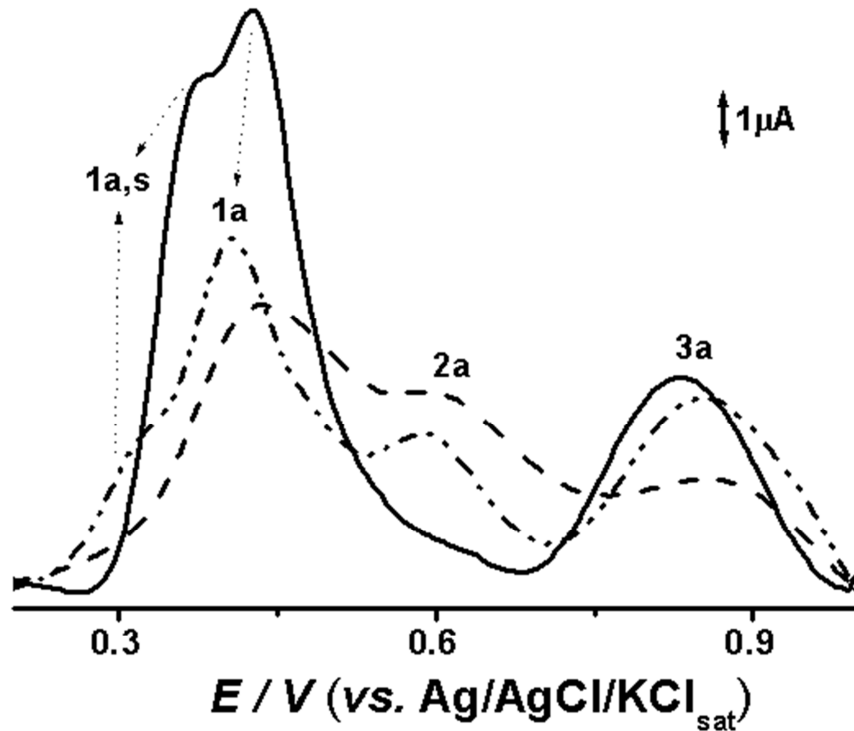


Voltamogramas médios obtidos por DPV em 3 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 5,0 e 2 mL de amostra, sendo elas: vinho tinto (—) e vinho branco (---). Largura de pulso: 5 mV; amplitude de pulso: 50 mV; taxa de scan 5 mV s<sup>-1</sup>.

A visualização de ombros e desdobramentos (Figura 26) está relacionada com a complexidade inerente à essas amostras e dependente dos procedimentos experimentais, como a diluição, o eletrodo e as condições eletrolíticas. No entanto, é possível padronizar o eletrólito e a diluição da amostra a fim de garantir a reprodutibilidade dos resultados e evitar erros de comparação.

Uma limitação importante para utilização de métodos voltamétricos é o fato de que a padronização da superfície do eletrodo não é possível visto que ela pode ser modificada durante a oxidação devido ao processo de adsorção. Tal processo varia de acordo com a composição fenólica da amostra, sendo que pode ou não ocorrer a passivação da superfície do eletrodo, o que dificulta a reprodutibilidade dos voltamogramas. Conseqüentemente, considerando-se que os ombros e os picos menores são mais difíceis de se reproduzir, eles não foram considerados no cálculo do EI.

**Figura 26:** Voltamogramas obtidos por DPV.



Voltamogramas obtidos por DPV em 3 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 5,0 e 2 mL de amostra, sendo elas: vinho branco frisanete (—), vinho rosê (- - -) e suco de uva tipo néctar (---). Largura de pulso: 5 mV; amplitude de pulso: 50 mV; velocidade de varredura 5 mV s<sup>-1</sup>.

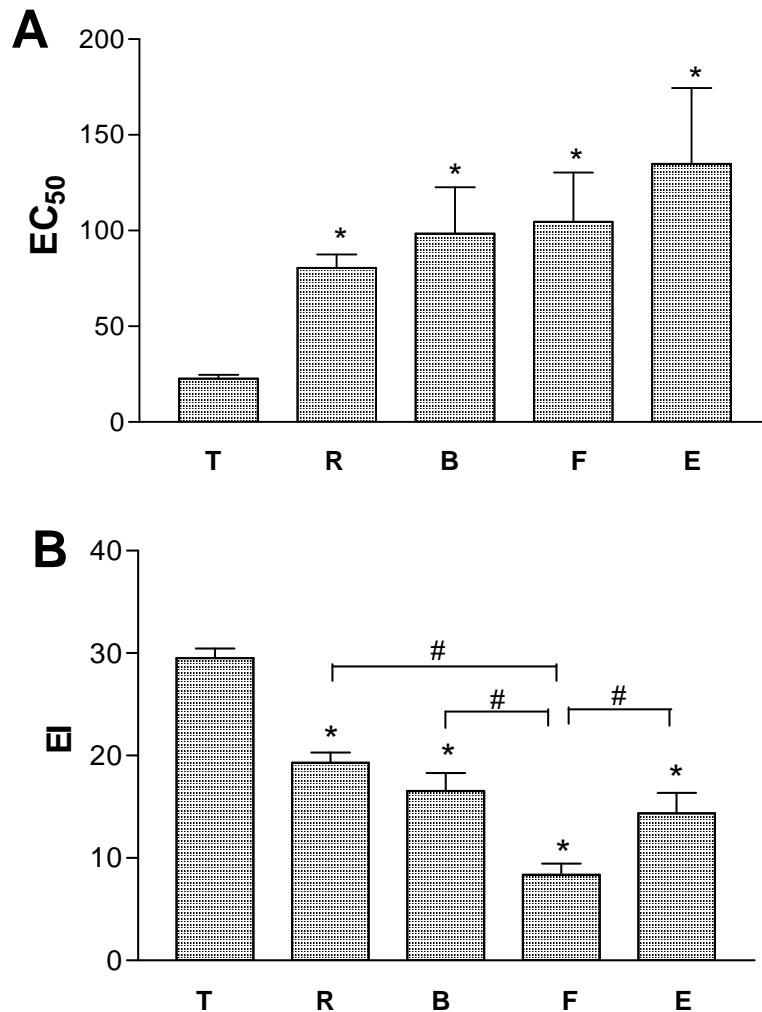
O valor médio do EI para os vinhos tintos é de 30,6  $\mu\text{A}/\text{mV}$  ( $n = 27$ ) e de 16,5  $\mu\text{A}/\text{mV}$  para os vinhos brancos ( $n = 6$ ), e vão de 24,3 - 43,5  $\mu\text{A}/\text{mV}$  a 8,5 - 20,2  $\mu\text{A}/\text{mV}$ , respectivamente. Tais valores apresentaram uma correlação negativa com os ensaios de DPPH. A mesma tendência foi observada para as outras categorias de vinho. O resultado de correlação de Pearson foi de -0,91097 e está ilustrado na Figura 27.

Qualquer desvio na correlação entre os dois métodos é claramente justificado pelos distintos princípios entre as análises espectrofotométricas e eletroanalíticas (Nair; Panneerselvam; Gopi, 2012; Pinchuk *et al*, 2012).

Além do índice eletroanalítico proposto por Blasco *et al* (2004), foi encontrado na literatura também um Índice de Atividade Antioxidante, proposto por Scherer & Godoy (2009), que também alegaram a necessidade de meios mais eficientes para a comparação dos resultados obtidos em diferentes estudos. Tal índice se baseia na atividade antioxidante determinada pelo método de DPPH e, ao contrário do EC<sub>50</sub>

ele apresenta uma correlação positiva com o índice aqui proposto, pois neste caso o DPPH foi expresso em equivalentes de um antioxidante padrão.

**Figura 27:** Correlação de Pearson entre os métodos de DPPH e DPV, usados para medir atividade antioxidante dos vinhos.



Gráficos representando EC<sub>50</sub> (A) e EI (B) de diferentes classes de vinhos (T = Tinto; R = Rosê; B = branco; F = fortificado E = Espumante). \* $P < 0,001$  comparado com T. # Denota diferença entre os grupos ( $P < 0,05$ ).

Embora a produção de vinhos siga alguns conceitos básicos, as variedades de uvas e algumas tecnologias de processamento divergem bastante, levando a uma grande diversidade de vinhos.

Uma vez que as principais ações biológicas de vinhos estão relacionados com a sua capacidade antioxidante, tal propriedade tem sido extensivamente estudada.

No entanto, não foi encontrado da literatura nenhum outro estudo que envolva variedade e diversidade tão grandes.

Estudos sobre a utilização de métodos eletroquímicos, como a voltametria e a amperometria, para avaliação da atividade antioxidante são cada vez mais comuns e tem se mostrado bastante úteis para esse fim. Uma abordagem que vem sendo utilizada é a fusão de métodos tradicionais como o DPPH com a amperometria, em que inicialmente é feita a reação da amostra com o radical e, em seguida, a atividade antioxidante da amostra é determinada com base no DPPH remanescente. Entretanto, essa determinação não é feita espectrofotometricamente como de costume e sim através da amperometria. Essa abordagem tem basicamente as mesmas limitações do teste de DPPH tradicional, exceto a interferência da coloração e da turbidez da amostra, que não afetam a amperometria (Milardović; Ivekovic; Grabarić, 2006; Milardović *et al*, 2005).

Constatou-se também que as variedades de uvas, bem como a parte do mundo em que o vinho foi produzido não tem grande influência na capacidade antioxidante. Por outro lado, esta propriedade é muito influenciada pela categoria e/ou variedade do vinho, sendo que os vinhos tintos, não-espumantes e mais novos representam as bebidas com ação antioxidante mais poderosas. Apesar de algumas exceções, a qualidade mostrou ter influência menor, mas importante sobre o poder antioxidante de vinhos.

É interessante observar também que o fermentado tinto de jabuticaba apresentou baixo  $EC_{50}$  e alto EI (Tabela 7), comparável com o de vinhos tintos secos, o que indica que essa bebida representa uma fonte de altos teores de compostos antioxidantes. Já a bagaceira apresentou Índice Eletroanalítico nulo, assim como a aguardente de jabuticaba, confirmando que os destilados apresentam atividade antioxidante muito baixa.

O uso de metodologias distintas a fim de obter resultados mais completos e precisos sobre o verdadeiro poder antioxidante é bastante útil na análise de amostras complexas.

**Tabela 7:** EC<sub>50</sub> e Índice eletroanalítico médio para grupos de amostra.

<b>Amostra</b>	<b>Número de amostras</b>	<b>IE (µA/mV)</b>
Vinhos tintos	27	30,6
Vinhos brancos	6	16,5
Vinhos rosês	3	15,8
Vinhos frisantes	5	14,1
Vinhos tintos doces	3	20,3
Vinhos fortificados	8	11,25
Bagaceira	1	0
Fermentado tinto de jabuticaba	1	37,7
Fermentado rosê de jabuticaba	1	23,4
Fermentado branco de jabuticaba	1	19,0
Aguardente de jabuticaba	1	0

A grande importância nutracêutica dos antioxidantes e as limitações dificuldades apresentadas pelos métodos clássicos para determinação da atividade antioxidante justificam a necessidade de desenvolvimento de novos métodos para esse fim.

Os métodos Folin-Ciocalteu, ABTS e DPPH são consagrados pelo uso. Entretanto, as dificuldades de execução desses métodos são inúmeras, além de que podem sofrer interferência de outras substâncias que não os compostos fenólicos de interesse.

Os métodos eletroanalíticos são de execução simples e rápida. Além disso, não envolvem o consumo de reagentes tóxicos, algo relevante em um momento em que a busca por métodos limpos é incessante.

A principal desvantagem encontrada na execução das técnicas eletroanalíticas foi o envenenamento do eletrodo de carbono vítreo devido à uma forte adsorção de compostos fenólicos. Após esse fato, observou-se que a repetibilidade das análises foi comprometida, o que determinou a troca desse eletrodo pelo de pasta de carbono, com o qual conseguimos uma repetibilidade satisfatória.

A necessidade do Índice Eletroanalítico foi levantada devido ao fato de que os voltamogramas resultantes da análise de amostras complexas são igualmente complexos, apresentando uma série de picos que ocorrem em potenciais diferentes

e com intensidades também diferentes. Ambos parâmetros, corrente e potencial de pico, são determinantes para expressar o poder antioxidante de amostras complexas. Assim sendo, tal índice, da forma como foi proposto, deve estimar de forma mais fidedigna a capacidade antioxidante de bebidas, extratos vegetais, alimentos, cosméticos e fitoterápicos, indicados por seu reconhecido poder antioxidante. Logo, nossa proposta abre caminho para que outros tipos de amostras sejam avaliadas por este método eletroanalítico simples, rápido e eficiente, permitindo uma boa comparação com resultados obtidos por análises tradicionais.

## 6 CONCLUSÕES

- As bebidas fermentadas de jabuticaba apresentaram alto potencial antioxidante, enquanto a aguardente, como era de se esperar devido ao processo de destilação, não apresentou.
- As bebidas de uva apresentaram alta atividade antioxidante, de acordo com o que já é apresentado na literatura.
- Houve boa correlação entre métodos eletroanalíticos e espectrofotométricos.
- Os processos de oxidação e redução dos compostos orgânicos dependem das condições do pH, sendo que o processo de adsorção é menos intenso em meio alcalino.
- O Índice Eletroanalítico possibilitou comparar a atividade antioxidante determinada pela voltametria de pulso diferencial.
- Não houve diferença significativa entre variedade de uva e região produtora de vinho.

## 7 REFERÊNCIAS

Adamczyk, B.; Adamczyk, S.; Smolander, A.; Kitunen, V. Tannic acid and Norway spruce condensed tannins can precipitate various organic nitrogen compounds. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 43, 628 – 637. 2011.

Almeida, S. S.; Souza, R. R.; Santana, J. C. C.; Tambourgi, E. B. Sensorial Analysis of Wines from *Malpighia glabra* L. Pulp. **Brazilian Journal of Operations & Production Management**, v. 5, n.1, p. 63 – 74. 2008.

Alonso, A. M.; Castro, R.; Rodriguez, M. C.; Guillçen, D. A.; Barroso, C. G. Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from Sherry wines and correlation with their content in polyphenols. **Food Research International**, v. 37, p. 715 – 721. 2004.

Aloys, N.; Angeline, N. Traditional fermented foods and beverages in Burundi. **Food Research International**, v. 42, p. 588 – 594. 2009.

AVF (American Vineyard Foudation). **American vineyard foudation provides over one million dollars in reserch funding to the wine & grape industry**. Press release. 2011. Disponível em: <<http://avf.org/>>. Acesso em: 06 novembro 2012.

Anderson, K.; Norman, D.; Wittwer, Glyn. Globalization and the World's Wine Markets: Overview. **Centre For International Economic Studies**, n. 0143. 2001.

Arribas, A. S.; Martínez-Fernández, M.; Chicharro, M. The role of electroanalytical techniques in analysis of polyphenols in wine. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 34, p. 78 – 96. 2012.

Arslan, G.; Yazici, B.; Erbil, M. The effect of pH, temperature and concentration on electrooxidation of phenol. **Journal of Hazardous Materials**, v. B124, p. 37 – 43. 2005.

Asquieri, E. R.; Silva, A. G. M.; Cândido, M. A. Aguardente de jabuticaba obtida da casca e borra da fabricação de fermentado de jabuticaba. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, n. 4, p. 896-904. 2009.

AWRI (Australian Wine Research Institute). **57<sup>th</sup> Annual Report**. 2011. Disponível em <<http://www.awri.com.au>>. Acesso em: 09 novembro 2012.

Aylward, D. A documentary of innovation support among new world wine industries. **Journal of Wine Research**, v.14, n.1. 2003.

Bail, S.; Stuebiger, G.; Krist, S.; Unterweger, H.; Buchbauer, G. Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 108, p. 1122 – 1132. 2008.

Balogh, E.; Hegedűs, A.; Stefanovits-Banyai, E. Application of and correlation among antioxidant and antiradical assays for characterizing antioxidant capacity of berries. **Scientia Horticulturae**, v. 125, p. 332 – 336. 2010.

Blasco, A. J.; González, M.C.; Escarpa, A. Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants. **Analytica Chimica Acta**, v. 511, p. 77 – 81. 2004.

Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v.26, p.1199 – 1200. 1958.

Borriello, A.; Cucciolla, V.; Ragione, F. D.; Galletti, P. Dietary polyphenols: Focus on resveratrol, a promising agent in the prevention of cardiovascular diseases and control of glucose homeostasis. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 20, p. 618 – 625. 2010.

Brett, C. M. A; Oliveira-Brett, A. M. **Electrochemistry. Principles, Methods and Applications**. Oxford, UK. 1993. 464p.

BRASIL. Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 09 de nov. 1988.

BRASIL. Decreto nº 2.314, de 04 de setembro de 1997. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 05 set. 1997.

Cabello-Hurtado, F.; Gicquel, M.; Esnault, M. A. Evaluation of the antioxidant potential of cauliflower (*Brassica oleracea*) from a glucosinolate content perspective. **Food Chemistry**, v.132, p. 1003 – 1009. 2012.

Cai, Y. Z.; Luo, Q.; Sun, M.; Corke, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, p. 2157 – 2184. 2004.

Caiconte, L. E. O. **Especiação e atividade antioxidante de íons hidroxiflavílio**. São Paulo. 2012. 94p.

Castro, C. S. P. **Utilização da Polarografia de Pulso Diferencial para estudo da Interação gama-tionina Slafa1-Ca(II)**. Brasília, DF. 1997. 87p.

Cavalcanti, R. N.; Veggi, P. C.; Meireles, M. A. A. Supercritical fluid extraction with a modifier of antioxidant compounds from jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) byproducts: economic viability. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1672 – 1678. 2011.

Cheng, F.; Breen, K. On the Ability of Four Flavonoids, Baicilein, Luteolin, Naringenin, and Quercetin, to Suppress the Fenton Reaction of the Iron-ATP Complex. **Biometals**, v. 13, p. 77 – 83. 2000.

Cook, N. C.; Samman, S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 66 – 76. 1996.

Corazza, M. L.; Rodrigues, D. G.; Nozaki, J. Preparação e Caracterização do Vinho de Laranja. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 449 – 452. 2001.

Corduneanu, O.; Janeiro, P.; Brett, A. M. O. On the electrochemical oxidation of resveratrol. **Electroanalysis**, v. 18, n. 8, p.757-762. 2006.

Cusmano, L.; Morrison, A.; Rabellotti, R. Catching-up trajectories in the Wine sector: a comparative study of chile, italy and south africa. **American association of wine economists - AAWE working paper**, n. 34. 2009.

Diculescu, V. C.; Satana, H. E.; Gil, E. S.; Brett, A. M. O. Methoxylation and Glycosylation Effect on the Redox Mechanism of Citroflavones. **Electroanalysis**, v. 24, n. 5, p.1019 – 1026. 2012.

Dogan-Topal, B.; Tuncel, S.; Ozkan, S. A. Anodic voltammetric behavior and determination of rosiglitazone in pharmaceutical dosage forms and biological fluids on solid electrode. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 13, n. 8, p.694-702.

Du, J.; He, Z. D.; Jiang, R. W.; Ye, W. C.; Xu, H. X.; But, P. P. H. Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L. **Phytochemistry**, v. 62, p. 1235–1238. 2003.

Duarte, W. F.; Dias, D. R.; Oliveira, J. M.; Teixeira, J. A.; Almeida, J. B. S.; Schwan, R. F. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabioba, jaboticaba and umbu. **Food Science and Technology**, v. 43, p.1564–1572. 2010.

Enache, T. A.; Oliveira-Brett, A. M. Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 655, p. 9 – 16. 2011.

Erlund, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, and epidemiology. **Nutritional Research**, v. 24, p. 851 – 874. 2004.

Estreicher, S. K. **Wine: the past 7,400 years**. 2004. Disponível em: <<http://www1.mpi-halle.mpg.de>>. Acesso em: 5 janeiro 2013.

Ferreira, M.; Varela, H.; Torresi, R. M.; Tremiliosi-Filho, G. Electrode passivation caused by polymerization of different phenolic compounds. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 2, p. 434-442, 2006.

Fortes, G. A. C., Naves, Sara S., Godoi, Fabiana F. F., Duarte, Alessandra R., Ferri, Pedro H., Santos, Suzana C. Assessment of a maturity index in jaboticaba fruit by the evaluation of phenolic compounds, essential oil components, sugar content and total acidity. **American Journal of Food Technology**, v. 6, p. 974–984. 2011.

Franquet-Griell, H.; Checa, A.; Núñez, O.; Saurina, J.; Hernández-Cassou, S.; Puignou, L. Determination of Polyphenols in Spanish Wines by Capillary Zone Electrophoresis. Application to Wine Characterization by Using Chemometrics. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 60, n. 34, p. 8340 – 8349. 2012.

Fu, W.; Chen, J.; Cai, Y.; Lei, Y.; Chen, L.; Pei, L.; Zhou, D.; Liang, X.; Ruan, J. Antioxidant, free radical scavenging, anti-inflammatory and hepatoprotective potential of the extract from *Parathelypteris nipponica* (Franch. et Sav.) **Journal of Ethnopharmacology**, v.130, p. 521–528. 2010.

Gattrell, M.; Kirk, D. W. A Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study of the Passive Film Produced during Aqueous Acidic Phenol Electro-oxidation. **Journal of Electrochemistry Society**, v. 139, n. 10, out. 1992.

Gené, R. M.; Segura, L.; Adzet, T.; Marin, E.; Iglesias, J. *Heterotheca inuloides*: Anti-inflammatory and analgesic effect. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 157 – 162. 1998.

Georgé, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, M. J. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 53, p. 1370 – 1373. 2005.

Gil, E. S. **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. São Paulo: Ed. Pharmabooks, 2007. p 485.

Gil, E. S.; Enache, A. T.; Oliveira-Brett, A. M. Anodic Behaviour of Flavonoids Orientin, Eriodictyol and Robinin at a Glassy Carbon Electrode. **Electroanalysis**, v.24, n. 7, p. 1576 – 1583. 2012.

Giuliani, E.; Morrison, A.; Pietrobelli, C.; Rabelotti, R. Who are the researchers that are collaborating with industry? An analysis of the wine sectors in Chile, South Africa and Italy. **Research Policy**, v.39, p.748 – 761. 2010.

Gorinstein, S.; Caspi, A.; Zemser, M.; Trakhtenberg, S. Comparative contents of some phenolics in beer, red and white wines. **Nutrition Research**, v. 20, n. 1, p. 131-139. 2000.

Gülçin, I.; Elmastas, M.; Aboul-Enein, H. Y. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 5, p. 489 – 499. 2012.

Gonçalves, D.; Couto, R. O.; Conceição, E. C.; Reis, N. S.; Gil, E. S. Voltametria De Pulso Diferencial (VPD) em Estado Sólido de Manchas de Cromatografia de Camada Delgada (CCD): Um Novo Método De Análise Para Fitoativos Antioxidantes. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 330 – 334, 2011.

Halliwel, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 16, p.33 – 50. 1996.

Harman, D. Aging: a Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. **Journals of Gerontology**, v.11, n. 3, p. 298 – 300. 1956.

Hättenschwiler, S.; Vitousek, P.M., The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling, **Trends in Ecology and Evolution**, v. 15, n. 6, p. 238. 2000.

Havsteen, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p.67 – 202. 2002.

Hayes, J. E.; Allen, P.; Brunton, N.; O'Grady, M. N.; Kerry, J. P. Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chemistry*, v. 126, p. 948–955, 2011.

He, J. B; Lin, X. Q; Pan, J. Multi-wall carbon nanotube paste electrode for adsorptive stripping determination of quercetin: a comparison with graphite paste electrode via voltammetry and chronopotentiometry. **Electroanalysis**, v. 17, n. 18, p. 1681 – 1686, 2005.

Hendrickson, H. P.; Kaufman, A. D.; Lunte, C. E. Electrochemistry of catechol-containing flavonoids. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v. 12, n. 3, p. 325 – 344. 1994.

Holland, J. A.; O'Donnell, R. W.; Chang, M. M.; Johnson, D. K.; Ziegler, L. M. Endothelial cell oxidant production: effect of NADPH oxidase inhibitors. **Endothelium**, v.7, n. 2, p. 109 – 119. 2000.

Horton, J. W. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. **Toxicology**, v. 189, p. 75 – 88. 2003.

Huang, T; Gao, P, Hageman, M. J. Rapid screening of antioxidants in pharmaceutical formulation development using cyclic voltammetry – potential and limitations. **Current Drug Discovery Technology**, v.1, n. 2, p.173 – 179. 2004.

IBRAVIN (Instituto Brasileiro do Vinho). **Demonstrativo da Elaboração de Vinhos e Derivados de 2004 até 2011 (RS)**. Disponível em <<http://www.ibravin.org.br/>>. Acesso em: 9 novembro, 2012.

Jaitak,V.; Sharma, K.; Kalia, K.; Kumar, N.; Singh, H.P.; Kaul, V.K.; Singh, B. Antioxidant activity of *Potentilla fulgens*: An alpine plant of western Himalaya. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 142–147, 2010.

Janeiro, P.; Oliveira-Brett, A. M. Catechin electrochemical oxidation mechanisms. **Analytica Chimica Acta**, v. 518, p. 109 – 115. 2004.

Janeiro, P.; Oliveira-Brett, A. M. Solid State Electrochemical Oxidation Mechanisms Of Morin in Aqueous Media. **Electroanalysis**, v. 17, n. 9. 2005.

Jorgensen, L. V.; Madsen, H. L.; Thomsen, M. K.; Dragsted, L. .; Skibsted, L. H. Regeneration of phenolic antioxidants from phenoxyl radicals: an ESR and electrochemical study of antioxidant hierarchy. **Free Radical Research**, v. 30, n. 3, p. 207-220, 1999.

Jovanovic, S. V.; Steenken, S.; Hara, Y.; Sismic, M. G. reduction potential of flavonoid and model phenoxyl radicals: which ring in flavonoids is responsible for antioxydant activity. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions**, v. 2, p.2497 – 2504. 1998.

Kumar, K. S.; Ganesan, K.; Subba-Rao P. V. Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty – An edible seaweed. K. **Food Chemistry**, v. 107, p. 289 – 295. 2008.

Labuda, J.; Buková, M.; Heilerová; Šilhár, S.; Štěpánek, I. Evaluation of the redox properties and anti/pro-oxidant effects of selected flavonoids by means of a DNA-based electrochemical biosensor. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, n. 2, p. 168-173, 2003.

Le, K.; Chiu, F.; Ng, Ken. Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. **Food Chemistry**, v. 105, p. 353 – 363. 2007.

Li, H.; Xia, N.; Förstermann, U. Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol. **Nitric Oxide**, v. 26, p. 102 – 110. 2012.

Lima, A. R.; Pereira, R. G. F. A.; Abrahão, S. A.; Duarte, S. M. S.; Paula, F. B. A. Compostos Bioativos Do Café: Atividade Antioxidante *In Vitro* Do Café Verde e Torrado Antes e Após a Descafeinação. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 20 – 24. 2010.

Llorach, R.; Espín, J. C.; Tomás-Barberán, F. A.; Ferreres, F.; Valorization of cauliflower (*Brassica oleracea* L. Var. *Botrytis*) by-products as a source of antioxidant phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n.8, p.2181 – 2187. 2003.

Lotito, S. B.; Frei, B. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting *in vitro* and *in vivo* effects. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, n. 2, p. 201 – 211. 2004.

Lu, M.; Yuan, B.; Zeng, M.; Chen, J. Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China. **Food Research International**, v. 44 p. 530 – 536. 2011.

Maeda, R. N.; Andrade, J. S. Aproveitamento do camu-camu (*Myrciaria dubia*) para produção de bebida alcoólica fermentada. **Acta Amazonica**, v. 33, n.3, p. 489 – 498. 2003.

Makhotkina, O.; Kilmartin, P. A. The phenolic composition of Sauvignon blanc juice profiled by cyclic voltammetry. **Electrochimica Acta**, v. 83, p. 188 – 195. 2012.

Makhotkina, O.; Kilmartin, P. A. The use of Cyclic Voltammetry for Wine Analysis: Determination of Polyphenols and Free Sulfur Dioxide. **Analytica Chimica Acta**, v. 668, p. 155 – 165. 2010.

Macnee, W.; Rahman, I. Oxidants and Antioxidants as Therapeutic Targets in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 160, p.58 – 65. 1999.

Mannino, S.; Brenna, O.; Buratti, S.; Cosi, M. S. A new method for the evaluation of the 'antioxidant power' of wines. **Electroanalysis**, v. 10, p. 908 – 912. 1998.

Manzano S, Williamson G. Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 54, n. 12, p.1773 – 1880. 2010.

Marathe, S.; Rajalakshmi, A. V.; Jamdar, S. N. Arun Sharma. Comparative study on antioxidant activity of different varieties of commonly consumed legumes in India. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2005 – 2012. 2011.

Martinelli Filho, A. **Tecnologia de vinhos e vinagres de frutas**. Piracicaba, SP, 1983.

Masek, A.; Zaborski, M.; Chrzescijanska, E. Electrooxidation of flavonoids at platinum electrode studied by cyclic voltammetry. **Food Chemistry**, v. 127, p. 699 – 704. 2011.

Mbaebie, B. O.; Edeoga, H. O.; Afolayan, A. J. Phytochemical analysis and antioxidants activities of aqueous stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 118 – 124. 2012.

Mercer, C. Brazil 'to double wine consumption' with supermarket deal. **Decanter**. Disponível em <<http://www.decanter.com>>. Acesso em: 9 novembro. 2012.

Milardović, S.; Ivekovic, D.; Grabarić, B. S. A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. **Bioelectrochemistry**, v. 68, p.175–180. 2006.

Milardović, S.; Ivekovic, D.; Rumenjak, V.; Grabarić, B. S. Use of DPPH•/DPPH Redox couple for Bioamperometric Determination of Antioxidant Activity. *Electroanalysis*, v. 17, n.20, p.1847 – 1853. 2005.

Mira, L.; Fernandez, M. T; Santos, M.; Rocha, R.; Florencio, M.H.; Jennings, K. R. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. **Free Radical Research**, v. 36, n. 11, p.1199 – 1208. 2002.

Miranda-Vilela, A.; Portilho, L. F. A.; Araujo, V. G. B.; Estevanato, L. L.C.; Mezzomo, B. P.; Santos, M. F. M. A.; Lacava, Z. G. M. The protective effects of nutritional antioxidant therapy on Ehrlich solid tumor-bearing mice depend on the type of antioxidant therapy chosen: histology, genotoxicity and hematology evaluations. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, p. 1091 – 1098. 2011.

Montoro, P.; Braca, A.; Pizza, C.; Tommasi, N. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. **Food Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 349–355. 2005.

Morton, J. Jaboticabas. **Fruits of warm climate**. Miami, FL. Creative Resource Systems. Miami, FL, 1987. 505p.

Munsie, J. A. **A Brief History of the International Regulation of Wine Production**. In: Food and Drug Law required course paper - Harvard Law School. mar. 2002.

Nair, V.; Panneerselvam, D. R.; Gopi, R. Studies on methanolic extract of Rauvolfia species from Southern Western Ghats of India – In vitro antioxidant properties, characterisation of nutrients and phytochemicals. **Industrial Crops and Products**, v. 39, p. 17– 25. 2012.

Nasr, B.; Abdellatif, G.; Cañizares, P.; Sáez, C.; Lobato, J.; Rodrigo, M. A. Electrochemical oxidation of hydroquinone, resorcinol, and catechol on boron-doped diamond anodes. **Environmental Science Technology**, v.39, n.18, p. 7234-7239. 2005.

Ndhkala, A. R.; Moyo, M.; Staden, J. Van. Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules? **Molecules**, v. 15, p. 6905 – 6930. 2010.

New Zealand Winegrowers. **Statistical Annual 2009**. Disponível em <<http://www.nzwine.com>>. Acesso em: 9 novembro 2012.

Oliveira, A. C. C.; Reis, N. S. **A importância dos antioxidantes e sua determinação pelos métodos eletroanalíticos**. Goiânia, GO, 2010. 65p.

Oliveira, L. A.; Lordelo, F. S.; Tavares, J. T. Q.; Cazetta, M. L. Elaboração de Bebida Fermentada Utilizando Calda Residual da Desidratação Osmótica de Abacaxi (*Ananas comosus* L.). **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, n.1, p. 702 – 712. 2012.

Oliveira-Filho, W. P. **Utilização da voltametria de redissolução anódica para o estudo da interação de três fragmentos peptídicos sintéticos da proteína príon com os íons cobre (III)**. Brasília, DF, 2006. 122 p.

Oliveira-Roberth, A.; Santos, D. I. V.; Cordeiro, D. D.; Lino, F. M. de A.; Bara, M. T. F.; Gil, E. S. Voltammetric determination of Rutin at Screen-Printed carbon disposable electrodes. **Central European Journal of Chemistry**, v.10, n. 5, p. 1609 – 1616. 2012.

OIV (Organização Internacional do Vinho). **Statistical Report on World Vitiviniculture**. Disponível em: <<http://www.oiv.int/>>. Acesso em: 22 de agosto de 2012.

Oueslati, S.; Trabelsi, N.; Boulaaba, M.; Legault, J.; Abdelly, C.; Ksouri, Riadh. Evaluation of antioxidant activities of the edible and medicinal Suaeda species and related phenolic compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 36, p. 513 – 518. 2012.

Penteado, M. V. C. **Vitaminas - Aspectos Nutricionais, Bioquímicos, Clínicos e Analíticos**. 1. Ed. São Paulo, 2002. 600 p.

Perez-Tortosa, V.; Lopez-Orenes, A.; Martinez-Perez, A.; Ferrer, M. A.; Calderon, A. A. Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. **Food Chemistry**, v.130, p. 362 – 369. 2012.

Pinchuk, I.; Shoval, H.; Dotan, Y.; Lichtenberg, D. Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. **Chemistry and Physics of Lipids**. 2012.

Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290 – 4302. 2005.

Rahman, I. Antioxidant therapies in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, v.1, n.1, p.15 – 29. 2006.

Ramos, C. L.; Almeida, E. G.; Pereira, G.; Melo, V.; Cardoso, P. G.; Dias, E. S.; Schwan, R. F. Determination of dynamic characteristics of microbiota in a fermented beverage produced by Brazilian Amerindians using culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, p. 225 – 231. 2010.

Re, R.; Pellegrini, N.; Protegent, 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. 1997.

Reis, N. S.; Serrano, S. H. P.; Meneghatti, R.; Gil, E. S. Métodos Eletroquímicos usados para Avaliação da Atividade Antioxidante de Produtos Naturais. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 6, p. 949–53. 2009.

Renaud, S.; Lorgeril, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **The Lancet**, v. 339, n. 8808, p. 1523–1526. 1992.

Reynertson, K. A.; Wallace, A. M.; Adachi, S.; Gil, R. R.; Yang, H.; Basile, M. J.; D'Armiento, J.; Weinstein, B.; Kennelly, E. J. Bioactive Depsides and Anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Journal of Natural Products**, v. 69, p.1228 – 1230. 2006.

Roussis, I. G.; Lambropoulos, I.; Tzimas, P.; Gkoulioti, A.; Marinos, V.; Tsoupeis, D.; Boutaris, I. Antioxidant activities of some Greek wines and wine phenolic extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 614 – 621. 2008.

Santana, J. C. C.; Dias, C. G.; Souza, R. R.; Tambourgi, E. B. Applying Of Neural Network on the Wine Sensorial Analysis From Barbados Cherry. **Journal of Food Process Engineering**, v. 33, p. 365–378. 2010.

Santos, D. T.; Meireles, M. A. A. Jaboticaba as a Source of Functional Pigments. **Pharmacognosy Reviews**, v. 3, n. 5, p. 127-132, 2009.

Santos, D. T.; Albuquerque, C. L. C.; Meireles, M. A. A. Antioxidant dye and pigment extraction using a homemade pressurized solvent extraction system. *Procedia Food Science*, v. 1, p.1581 – 1588. 2011.

Santos, D. T.; Veggi, P. C. M.; Meireles, A. A. Extraction of antioxidant compounds from Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: Yield, composition and economical evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 101, p. 23–31. 2010.

Santos, M. H.; Batista, B. L.; Duarte, S. M. S.; Abreu, C. M. P.; Gouvêa, C. M. C. P. Influência Do Processamento e da Torrefação Sobre a Atividade Antioxidante do Café (*Coffea arabica*). *Química Nova*, v. 30, n. 3, p. 604–610. 2007.

SAWIT (South African Wine Industry Trust – SAWIT). Disponível em: <<http://avf.org/>>. Acesso em: 06 nov. 2012.

Shin, T. Y.; Kim, S. H.; Suk, K.; Ha, J. H.; Kim, I.; Lee, M. G.; Jun, C. D.; Kim, S. Y.; Lim, J. P.; Eun, J. S.; Shin, H. Y.; Kim, H. M. Anti-allergic effects of *Lycopus lucidus* on mast cell-mediated allergy model. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 209, p. 255 – 262. 2005.

Scherer, R.; Godoy, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, v. 112, p. 654–658. 2009.

Silva, M. M.; Santos, M. R.; Caroço, G.; Rocha, R.; Justino, G.; Mira, L. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination, v. 36, n. 11, p. 1219 – 1227. 2002.

Silva, N. S.; Silva, B. A.; Souza, J. H. P.; Dantas, V. V., Kledson Batista dos Reis; Silva, E. V. C. Elaboração de Bebida Alcoólica fermentada a partir do suco de Manga Rosa (*Mangifera indica* L.). **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 5, n.1, p.367 – 378, 2011.

Silva, P. H. A.; Faria, F.; Tonon, C. B.; Mota, S. J. D.; Pinto, V. T. Avaliação da composição química de fermentados alcoólicos de jabuticaba (*Myrciaria jabuticaba*). **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 595 – 600. 2008.

Simic, A.; Manojlovic, D.; Segan, D.; Todorovic, M., Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. **Molecules**, v.12, n. 10, p. 2327 – 2340. 2007.

Singleton, V. L.; Rossi Jr., J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158. 1965.

Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Cbch, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6.ed. Porto Alegre, RS, 2009. 1056 p.

Souza, F. K. F.; Luz, R. O.; Santos, C. M. E.; Pietrowski, G. A. M.; Wosiacki, G. Alessandro Nogueira. Desenvolvimento de Fermentadores em Série Para o Estudo Cinético de Fermentado de Maçã. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 5, n. 1, p. 379–386, 2011.

Suh, H. J.; Kim, S. R.; Hwang, J. S.; Kim, M. J.; Iksoo Kim. Antioxidant activity of aqueous methanol extracts from the lucanid beetle, *Serrognathus platymelus castanicolor* Motschulsky (Coleoptera: Lucanidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 14, p. 95–98. 2011.

Sun, L.; Zhang, J.; Lu, X.; Zhang, L.; Zhang, Y. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2689 – 2696, 2011.

Takashima, M.; Horie, M.; Shichiri, M.; Hagihara, Y.; Yoshida, Y.; Niki, E. Assessment of antioxidant capacity for scavenging free radicals in vitro: A rational basis and practical application. **Free Radical Biology & Medicine**, v.52, p. 1242 – 1252. 2012.

Terpinca, P.; Cehb, B.; Ulriha, N. P.; Abramovic, H. Studies of the correlation between antioxidant properties and the total phenolic content of different oil cake extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 39, p. 210 – 217. 2012.

Thomas, R. H.; Bernards, M. A.; Drake, E. E.; Guglielmo, C. G. Changes in the antioxidant activities of seven herb- and spice-based marinating sauces after cooking. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 244 – 252. 2011.

UVIBRA (União Brasileira de Vitivinicultura). **Vinhos & Saúde**. Disponível em <<http://www.uvibra.com.br/>>. Acesso em: 9 de novembro de 2012.

Valko, M.; Rhodes, C. J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, 1 – 40. 2006.

Vasconcelosa, P. C. P.; Andreob, M. A.; Vilegasb, W.; Hiruma-Limaa, C. A.; Pellizzon, C. H. Effect of Mouriri pusa tannins and flavonoids on prevention and treatment against experimental gastric ulcer. **Journal of Ethnopharmacology**, v.131, p.146–153. 2010.

Veggi, P. C.; Santos, D. T. M.; Meireles, A. A. Anthocyanin extraction from Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins by different techniques: economic evaluation. **Procedia Food Science**, v.1, p. 1725 – 1731. 2011.

Vino Argentino Bebida Nacional. **Vitivinicultura Argentina**. Disponível em: <<http://www.vinoargentinobebidanacional.com/vitargentina/>>. Acesso em: 9 de novembro de 2012.

Wine Institute. **California Wine Profile 2011**. Disponível em: <<http://www.wineinstitute.org/>>. Acesso em: 06 de novembro de 2012.

Wines of Brazil, 2012. **Sala de Imprensa**. Disponível em <<http://www.winesofbrasil.com/>>. Acesso em: 9 de novembro de 2012.

Wines of Chile. **News and Events**. Disponível em <<http://www.winesofchile.org/>>. Acesso em: 9 de novembro de 2012.

Wines of Uruguay, 2012. **Noticias**. Disponível em <<http://winesofuruguay.com>>. Acesso em: 9 de novembro 2012.

Wojdyło, A.; Oszmianski, J.; Czemerys, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v. 105, p. 940 –949. 2007.

Yu, J. Q.; Lei, J. C.; Zhang, X. Q.; Yu, H. D.; Tian, D. Z.; Liao, Z. X.; Zou, G. L. Anticancer, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Lycopus lucidus* Turcz. var. *hirtus* Regel. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1593 –1598. 2011.