



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
Centro de Ciências Exatas e da Natureza  
Departamento de Química Fundamental  
Programa de Pós-Graduação em Química

**Reação flash em cela de fluxo acoplada ao detector para  
determinação de polifenóis em bebidas**

**Suelle Gisian Farias de Assis**

Dissertação de Mestrado

Recife

2014

**Suelle Gisian Farias de Assis**

**Reação flash em cela de fluxo acoplada ao detector para  
determinação de polifenóis em bebidas**

Texto apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte integrante do requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica.  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula S. Paim.

Recife

2014

Catálogo na fonte  
Bibliotecário Jefferson Luiz Alves Nazareno CRB 4-1758

A848r

Assis, Suelle Gisian Farias de.

Reação flash em cela de fluxo acoplada ao detector para determinação de polifenóis em bebidas / Suelle Gisian Farias de Assis – 2014.  
58f.: fig.; tab.

Orientadora: Ana Paula Silveira Paim.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN.  
Química fundamental. Recife, 2014.

Inclui referências.

1. Química analítica. 2. Análise em fluxo. 3. Multicomutação. I. Paim, Ana Paula Silveira. (Orientadora). II. Título.

543 CDD (22. ed.)

UFPE-FQ 2017-

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovada:

---

**Prof<sup>a</sup> Ana Paula Silveira Paim**  
(Orientadora)  
Departamento de Química Fundamental  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Prof. André Fernando Lavorante**  
Departamento de Química  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

**Prof<sup>a</sup> Fabíola Soraia Vital Campos Barbosa da Silva**  
Instituto Federal de Educação Ciência e  
Tecnologia de Pernambuco

**Reação flash em cela de fluxo acoplada ao  
detector para determinação de polifenóis em  
bebidas**

**Por**

**Suelle Gisian Farias de Assis**

Departamento de Química Fundamental  
Centro de Ciências Exatas e da Natureza  
Universidade Federal de Pernambuco  
Recife-PE-Brasil  
14 de Abril de 2014

## **Agradecimentos**

Primeiramente a Deus, por encontrar forças nele em todas as fases da minha vida;

À minha orientadora e amiga prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Ana Paula S. Paim, pela longa trajetória em seu laboratório concedendo assistência acadêmica e pessoal, pelo carinho e dedicação;

Aos professores que contribuíram para minha formação desde a graduação e me ajudaram academicamente. Agradeço à Paulo Menezes, Severino Alves Junior, Raphael Henrique, Ricardo Longo, Oscar L. Malta;

À Maurílio, Patrícia e Eliaquim, pelas ajudas com os problemas burocráticos e também ao Sr. Wellington, por tanto ser aquele "pau pra toda obra" nos momentos de necessidade no DQF;

Aos antigos e atuais membros do Laboratório de Instrumentação e Automação para Análises Química (LIAAQ) os quais tive convívio e que sempre me ajudaram;

Ao prof. Boaventura e à prof. <sup>a</sup> do Porto Maria Conceição, pela assistência ao longo desse trabalho, tirando dúvidas e propondo soluções;

À Euzébio por ter me ajudado a fazer análise de UV no laboratório do prof. André Galembeck;

Aos profissionais da Central Analítica, que sempre me ajudaram e disponibilizavam até mesmo água para trabalho;

À Marcelo, pela sua ajuda acadêmica e pessoal que quase sempre tava disponível quando eu precisava, até mesmo quando estava morando em outro estado, que tanto contribui para que esse trabalho fosse finalizado, nos meus conhecimentos acadêmicos e saúde mental;

À Diego, que sempre perguntava sobre o andamento do trabalho e até tentava ajudar com o mesmo;

Aos meus pais, que sempre me apoiaram em toda a trajetória de estudos, desde a graduação, sempre dando toda a assistência possível;

Aos amigos de curso e disciplinas Amanda, Elaine, Carolina, Danilo e Rodolfo pela união e apoio;

Aos amigos de curso e de momentos de descontração Viviane, Clébson, Fred, Rodrigo, Mariana, Talita e Thiago.

Aos inúmeros amigos que adquiri no departamento, que ajudaram e apoiaram em outros trabalhos ou em estudos;

Aos meus tios e primos, Dinamérico, Maria José, Elaine e Aline, que abriram as portas da sua casa para mim e me apoiaram nos momentos em que precisava estudar, dormir, pelos momentos de relaxamento e desabafo. E aos demais membros da minha família que me torceram por mim e me ajudaram;

À todos aqueles que não estão na lista, mas que passaram em algum momento, ou até mesmo param para me escutar;

Agradeço à CAPES e ao CNPq pelo fornecimento das bolsas de estudo que me permitiram realizar este mestrado;

À David, pela força, incentivo, por ter me aguentado nos momentos de estresse, pelos carinhos e sempre acreditar em mim. Muito obrigada, Pasquinel.

“Não desista, o desafio de agora é  
tarefa concluída no futuro”.  
(André Luís)

## Resumo

Os polifenóis são uma classe de compostos bioativos encontrados em frutas, verduras e cereais. Esses alimentos são fontes de estudos e se encontram associados a diversos benefícios à saúde, como anticancerígeno, anti-inflamatório, na prevenção de doenças cardiovasculares e de diversas doenças degenerativas. Os métodos analíticos usados para a determinação de compostos polifenólicos, geralmente envolvem métodos extrativos à temperatura ambiente ou com refluxo como a técnica em Soxhlet, ultrasom, fluido supercrítico, microondas e técnicas de extração a elevadas pressões. Neste trabalho, propõe-se uma alternativa simples, econômica e robusta para a determinação de polifenóis totais, expressos em ácido gálico em amostras de vinho e chá. O sistema proposto consiste em uma cela de detecção que permite a inserção do reagente e da amostra direto no caminho óptico, tendo assim a reação instantânea. Para a inserção das soluções de amostra e reagente empregou-se o conceito de multicomutação em fluxo. A reação da análise envolve a oxidação dos compostos polifenólicos das amostras com o uso de hipoclorito e, posteriormente, ocorre a detecção fotométrica a 490 nm. Após a otimização do sistema proposto, os valores selecionados foram: solução  $17,82 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  hipoclorito em pH 11,0 (tampão tetraborato de sódio/hidróxido de sódio); 15 pulsos de soluções de amostra (66  $\mu\text{L}$ ) de reagente (298,5  $\mu\text{L}$ ). Obteve-se resposta linear na faixa de 50 a 1000 mg  $\text{L}^{-1}$  de ácido gálico; LD = 21 mg  $\text{L}^{-1}$ ; RSD de 1,9 % (400 mg  $\text{L}^{-1}$ , n=20); volume de resíduo gerado por determinação de 0,97 mL por determinação; e frequência analítica de 120 amostras por hora. O método foi aplicado para 7 amostras de vinhos tintos comerciais do Vale do São Francisco, Rio Grande do Sul e da Argentina e 20 amostras de chá, sendo 12 de chá preto e 8 de chá verde, oriundas do Brasil. A exatidão foi avaliada através dos testes de recuperação usando o método de adição padrão para as amostras de chá e vinho.

Palavras-chave: Multicomutação. Polifenol. Vinho. Chá.

## Abstract

Polyphenols are a class of bioactive compounds found in fruits, vegetables and grains. These foods are sources of studies and are associated with various health benefits such as anti-cancer, anti-inflammatory, prevention of various cardiovascular diseases and degenerative diseases. The analytical methods used for the determination of polyphenolic compounds, extractives usually involve at room temperature or under reflux methods as Soxhlet, ultrasound, supercritical fluid, microwave extraction techniques and elevated pressures. In this work, we propose a simple, economical and robust alternative for the determination of total polyphenols, expressed as gallic acid. The proposed system consists of a detection cell that allows the insertion of reagent and sample direct in the optical path, thus having the instant reaction. For insertion of sample and reagent solutions, we used the concept of multicommutation in flow analysis. The analysis involves the reaction of oxidation of polyphenolic compounds of the samples with the use of hypochlorite and subsequently photometric detection occurs at 490 nm. After optimization of the proposed system, the selected values were: solution  $17.82 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  hypochlorite at pH 11.0 buffer (sodium tetraborate / sodium hydroxide), 15 pulses of sample solutions (66  $\mu\text{L}$ ) and reagent (298.5  $\mu\text{L}$ ). Was obtained in the linear response range of 50 to 1000  $\text{mg L}^{-1}$  of gallic acid; LD = 21  $\text{mg L}^{-1}$ ; RSD 1.9% (400  $\text{mg L}^{-1}$ , n = 20); volume of waste generated by determination of 0.97 mL per sample and analytical frequency of 120 samples per hour. The method was applied to 7 samples of commercial red wines from the São Francisco Valley, Rio Grande do Sul and Argentina and 20 tea samples, 12 black tea and green tea 8, from Brazil. The accuracy was assessed through recovery test using method of standard additions for samples of tea and wine.

Keywords: Multicommutation. Polyphenol. Wine. Tea.

## Lista de Figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Esquema mostrando a divisão dos polifenóis. ....   | 14 |
| Figura 2: Processo de oxidação dos polifenóis.....   | 14 |
| Figura 3: Estrutura química dos flavonóides.....   | 15 |
| Figura 4: Evolução de acordo com o tempo da análise em fluxo.....  | 23 |
| Figura 5: Reação proposta entre o ácido gálico e o íon hipoclorito. ....   | 26 |
| Figura 6: Interface eletrônica baseada no CI ULN2803 para controle das minibombas solenóides (Vx) através da porta serial (DB25).....  | 29 |
| Figura 7: Fontes de alimentação para o acionamento (a) das minibombas e (b) para o fotômetro. LM337 e LM317 = reguladores ajustáveis de voltagem para negativo e positivo, respectivamente, E = entrada, S = saída, A = ajuste, Dx = diodos zener, C = capacitor, Rx = resistores. ....  | 31 |
| Figura 8: Foto da caixa metálica (a) com a cela de fluxo e parte eletrônica (b).....   | 32 |
| Figura 9: Cela de fluxo utilizada. Det = fotodetector OPT301; S <sub>0</sub> = sinal em mV; gc – cilindros de vidro, comprimento de 20 mm e diâmetro menor de 1,2 mm; mp = junção do tubo no cilindro; gt = corpo da cela de fluxo, tubo de vidro (boro-silicato), diâmetro interno de 1,2 mm; In = entrada das soluções de amostras e hipoclorito ou H <sub>2</sub> O e out = saída das soluções para o descarte; LED – diodo emissor de luz, 5 mm de diâmetro, máximo de emissão 490 nm; Tr = transistor BC547; I = feixe de radiação emitido pelo LED; II = feixe de radiação chegando ao fotodetector (DET) após a transmissão através da cela de fluxo..... | 32 |
| Figura 10: a) Diagrama do sistema em fluxo utilizado na determinação de polifenóis. A = Amostra ou solução de referência; C = Solução transportadora (H <sub>2</sub> O); R1 = Solução de hipoclorito; Det = Detector (fotômetro), fonte LED a 490 nm; D = descarte; P1, P2, P3= minibombas solenóide; y: junção feita de acrílico. Posições ON e OFF representam as minibombas ligada e desligada, respectivamente. b) Cela de fluxo. En: entrada (amostra e hipoclorito); Sd: saída (descarte); Cv: guia de onda; Tb: tudo de vidro. Det: detector, OPT301. ....  | 33 |
| Figura 11: Fluxograma esquemático do programa escrito para o sistema em fluxo estudado, onde P1 = pulsos de padrão ou amostra, P2=pulsos do carregador ou transportador, P3 = pulsos de reagente, NLC= número de ciclos de leitura e NR= número de replicatas. ....  | 34 |
| Figura 12: Gráfico de absorvância obtido para o ácido gálico (linha preta), água sanitária (linha vermelha) e ácido gálico em água sanitária (linha azul). ....  | 39 |
| Figura 13: Sinal obtido no sistema para 3 ciclos de leitura (NCL = 3) e 4 replicatas (NR = 4) nas mesmas condições reacionais.....   | 41 |
| Figura 14: Sinais obtidos no sistema reacional com NCL=1 e NR=5 e concentração de ácido gálico de 250 mg L <sup>-1</sup> a) P1 e P3 são mantidos na frequência de 5 pulsos. b) P1 e P3 são mantidos na frequência de 10 pulsos.....  | 42 |
| Figura 15: a) Ruído instrumental observado com a utilização de água em todas as minibombas b) Ampliação da escala de (a).....  | 42 |
| Figura 16: Avaliação da reprodutibilidade do método proposto. Àcido gálico 400 mg L <sup>-1</sup> . ....   | 43 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 17: Curva analítica obtida na faixa de concentração de 50 a 1000 mg L <sup>-1</sup> de ácido gálico para avaliar o solvente (ácido ou básico) do hipoclorito. ....  | 44 |
| Figura 18: Comparação dos coeficientes de correlação obtidos para diferentes solventes, em meio alcalino, da solução de hipoclorito: NaOH, H <sub>2</sub> O (pH 11), Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> e Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> . ....              | 45 |
| Figura 19: Sinais obtidos no sistema para a concentração de 0-100 mg L <sup>-1</sup> de ácido gálico variando-se o solvente do hipoclorito. a) Água (pH 11) como dissolvente do hipoclorito com o sinal do branco sendo repetido por 10 vezes. b) Tampão carbonato. .... | 45 |
| Figura 20: Respostas obtidas do coeficiente de correlação (r) e angular (a) da curva analítica em função da variação do pH na solução de hipoclorito. ....   | 46 |
| Figura 21: Estudo do número de pulsos de amostra e reagente. ....  | 48 |

## Lista de Tabelas

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Resultados obtidos para o cálculo do volume das minibombas e seu desvio padrão (SD). .....  | 40 |
| Tabela 2: Valores obtidos de coeficiente de correlação e coeficiente angular em função da concentração do hipoclorito. ....   | 47 |
| Tabela 3: Parâmetros selecionados para o sistema em fluxo proposto.....   | 48 |
| Tabela 4: Figuras de mérito obtidas para a metodologia.....   | 49 |
| Tabela 5: Níveis de tolerância para possíveis interferentes no vinho e chá. ....  | 50 |
| Tabela 6: Resultados das concentrações de ácido gálico obtidos nas amostras de chá e vinho analisados e % de recuperação para as adições de 100 e 300 mg L <sup>-1</sup> de ácido gálico..... | 51 |

# Sumário

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Introdução .....</b>                                | <b>13</b> |
| 1.1 <i>Parte Teórica .....</i>                            | 13        |
| 1.1.1 Polifenóis .....                                    | 13        |
| 1.1.2 Origem e composição do vinho .....                  | 15        |
| 1.1.3 Origem e composição do chá .....                    | 16        |
| 1.2 <i>Revisão Bibliográfica .....</i>                    | 17        |
| 1.2.1 Polifenóis em vinhos.....                           | 18        |
| 1.2.2 Polifenóis em chás.....                             | 20        |
| 1.2.3 Análise em fluxo .....                              | 22        |
| <b>2. Objetivos.....</b>                                  | <b>26</b> |
| 2.1 <i>Objetivo Geral.....</i>                            | 26        |
| 2.2 <i>Objetivo Específico.....</i>                       | 26        |
| <b>3. Materiais e Métodos .....</b>                       | <b>27</b> |
| 3.1 <i>Reagentes e Soluções.....</i>                      | 27        |
| 3.1.1 Soluções Estoque.....                               | 27        |
| 3.1.2 Padronização e preparo de soluções .....            | 28        |
| 3.1.2.1 Hipoclorito de sódio .....                        | 28        |
| 3.1.2.2 Ácido gálico.....                                 | 29        |
| 3.2 <i>Sistema em fluxo.....</i>                          | 29        |
| 3.2.1 Descrição geral do sistema .....                    | 29        |
| 3.2.2 Descrição do módulo de análise .....                | 33        |
| 3.3 <i>Estudo do comprimento de onda .....</i>            | 35        |
| 3.4 <i>Avaliação da vazão das minibombas.....</i>         | 35        |
| 3.5 <i>Estudo do ruído do sistema .....</i>               | 36        |
| 3.6 <i>Estudo dos parâmetros do sistema em fluxo.....</i> | 36        |
| 3.6.1 Estudo do solvente para o hipoclorito .....         | 36        |
| 3.6.2 Estudo do pH da solução do hipoclorito.....         | 36        |
| 3.6.3 Estudo da concentração do hipoclorito.....          | 36        |
| 3.6.4 Estudo do número de pulsos .....                    | 37        |
| 3.7 <i>Figuras de Mérito.....</i>                         | 37        |
| 3.8 <i>Amostras utilizadas e preparo.....</i>             | 37        |
| 3.8.1 Amostras de chá .....                               | 37        |
| 3.8.2 Amostras de vinho .....                             | 38        |
| <b>4. Resultados e Discussão .....</b>                    | <b>38</b> |
| 4.1 <i>Estudo do comprimento de onda .....</i>            | 39        |
| 4.2 <i>Avaliação da vazão das minibombas.....</i>         | 40        |

|  |           |
|--|-----------|
| <i>4.3 Funcionamento da metodologia em fluxo</i> .....     | 41        |
| <i>4.4 Avaliação do ruído do sistema</i> .....             | 42        |
| <i>4.5 Estabilidade dos Reagentes</i> .....                | 43        |
| <i>4.6 Estudo dos parâmetros do sistema em fluxo</i> ..... | 44        |
| 4.6.1 Estudo do solvente para o hipoclorito .....          | 44        |
| 4.6.2 Estudo do pH da solução do hipoclorito .....         | 45        |
| 4.6.3 Estudo da concentração do hipoclorito .....          | 46        |
| 4.6.4 Estudo do número de pulsos .....                     | 47        |
| <i>4.7 Figuras de Mérito</i> .....                         | 48        |
| <i>4.8 Interferentes</i> .....                             | 49        |
| <i>4.9 Análise das amostras</i> .....                      | 51        |
| <b>5. Conclusão</b> .....                                  | <b>52</b> |
| <b>Referências</b> .....                                   | <b>53</b> |

# 1.Introdução

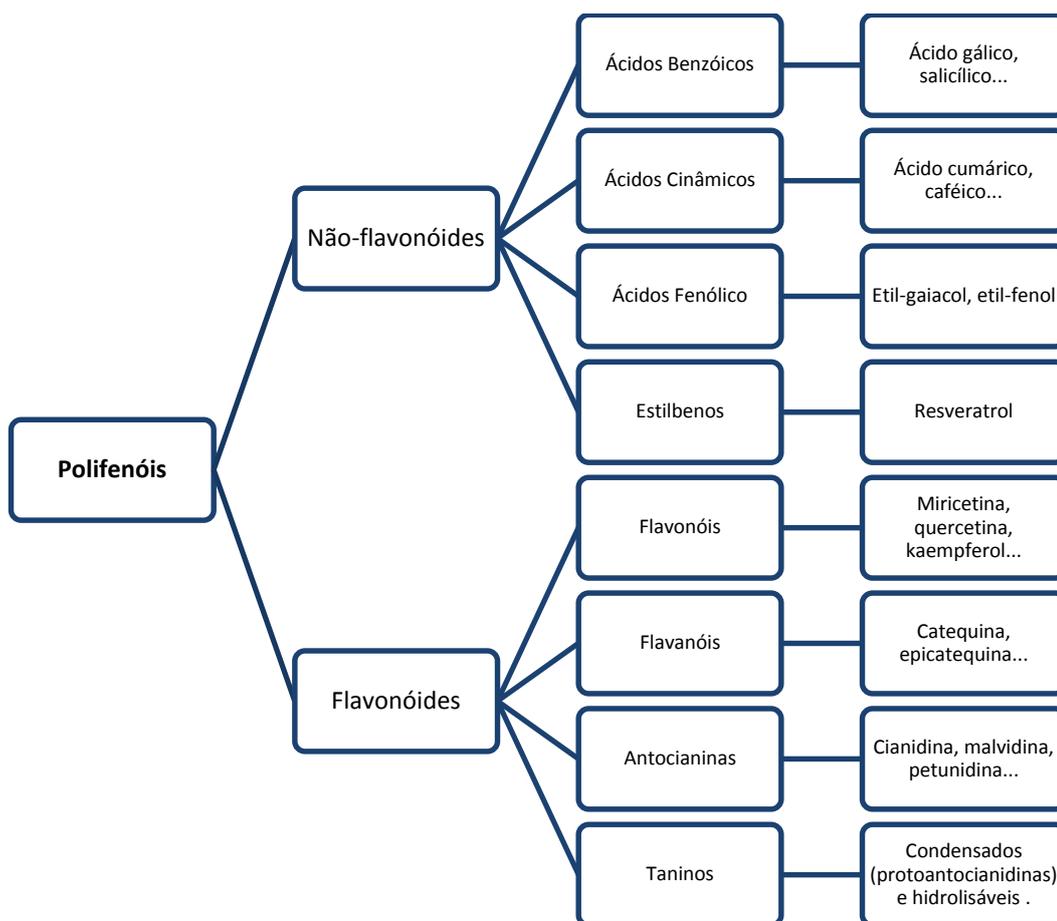
## 1.1 Parte Teórica

### 1.1.1 Polifenóis

O nascimento da bioquímica dos radicais livres aconteceu no final da Segunda Guerra Mundial (1939-1945) quando duas bombas atômicas atingiram as cidades de Hiroshima e Nagasaki no final da Segunda Guerra Mundial (1939-1945). Em 1954, Gershman e Gilbert sugeriram que os efeitos letais da radiação ionizante poderia ser devido à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). A partir desse período, os radicais livres como os ROS e as espécies reativas de nitrogênio (RNS) passaram a ser alvo de pesquisas<sup>1</sup>.

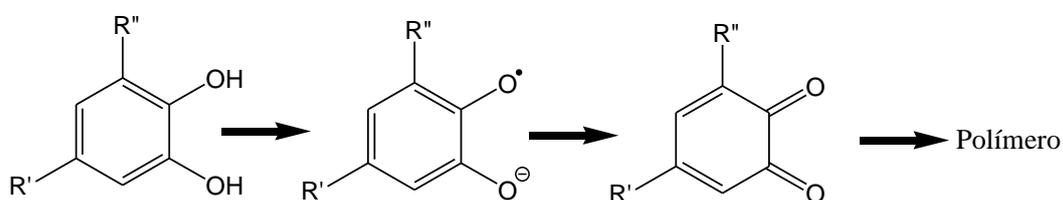
Diante de diversos estudos, foi possível verificar que os radicais livres e outros oxidantes são os principais responsáveis por diversas doenças degenerativas como o câncer, aterosclerose (entre outras doenças do coração), disfunções cerebrais, entre outras. O controle desses radicais é feito por compostos antioxidantes, os quais podem ser sintetizados no próprio organismo ou podem ser obtidos da dieta alimentar. Entre os que são encontrados em alimentos, é possível destacar os tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenóides<sup>2-5</sup>.

Os polifenóis são compostos químicos que podem variar sua estrutura, desde um simples fenol até moléculas grandes condensadas entre si. Eles podem se dividir em flavonóides e não-flavonóides, como mostrado na figura 1<sup>6-7</sup>.



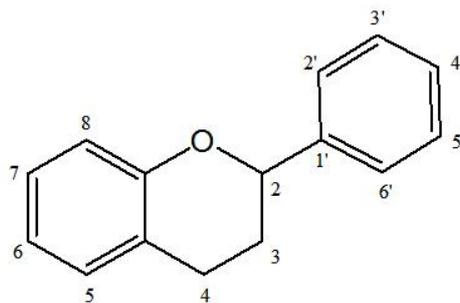
**Figura 1:** Esquema mostrando a divisão dos polifenóis.

A ação dos polifenóis se dá pela sua capacidade de doar elétrons, ocorrendo assim uma reação de oxirredução, prevenindo ou diminuindo a ação oxidativa dos radicais livres ao sistema biológico. A reação dos polifenóis totais, envolve inicialmente a oxidação da diiona, como mostrado na figura 2<sup>4,8,9</sup>.



**Figura 2:** Processo de oxidação dos polifenóis.

Para os vinhos, os flavonóides (figura 3) são responsáveis pela coloração, as alterações na cor e aroma se devem aos não-flavonóides, devido as oxidações que liberam fenóis voláteis. Os flavonóis e flavanóis são as classes de compostos responsáveis pela coloração amarelada, enquanto que as antocianinas são responsáveis pela coloração avermelhada<sup>9,10</sup>.



**Figura 3:** Estrutura química dos flavonóides.

Enquanto que no chá, a variação de cor das suas folhas é devido a fermentação, as quais são classificadas em três tipos, de acordo com o grau de fermentação: não-fermentado (verde), semi-fermentado (oolong) e fermentação total (preto). O grau de fermentação leva a diferentes níveis de oxidação<sup>11-13</sup>.

De acordo com a literatura, para determinar o teor de polifenol de uma classe é comum escolher um composto da sua subclasse e expressar sua concentração total em termos daquela molécula. O teor das antocianinas é descrito em termos da malvidina, já para polifenóis totais, ele é expresso em termos do ácido gálico ou ácido cafeico<sup>14</sup>.

### 1.1.2 Origem e composição do vinho

O vinho é uma das bebidas mais antigas do mundo e suas primeiras citações são datadas da época do Egito antigo a cerca de 3 mil anos a.C. A trajetória territorial da vinha vai desde a Ásia Ocidental e Europa, passando pela Ásia Menor, Oriente Médio e Mediterrâneo, entre outras regiões. Entre os países do mediterrâneo é possível citar Portugal, Espanha, Itália e França, como elaboradores dos melhores vinhos do mundo<sup>15,16</sup>.

A parreira foi introduzida no Brasil em 1532 por Martin Afonso de Souza na capitania de São Vicente em São Paulo. Com o intuito de avaliar regiões onde a videira melhor se adaptasse para o plantio, ela foi levada para o Rio Grande do Sul, estado que até hoje é o principal representante nacional de vinhos. Em seguida as videiras se espalharam por diversos estados do Brasil<sup>15,16,17</sup>.

No Vale do São Francisco (VSF), a viticultura foi introduzida em 1950 pela atual Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba (CODEVASF). Porém, somente em 1975, com a iniciativa dos pesquisadores da Embrapa Semi-árido, iniciaram-se pesquisas com o intuito de desenvolver produtos característicos e adaptados à região<sup>18,19</sup>.

O VSF compreende a região da bacia do São Francisco, que engloba os estados de Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Minas Gerais, Goiás e o Distrito Federal, e é subdividido em quatro regiões: Alto, Médio, Submédio e Baixo São Francisco<sup>19,20</sup>.

Em 2012, cerca de 60% das uvas produzidas no Brasil foram destinadas ao processamento para obtenção de vinho, suco e derivados, sendo o restante da produção destinado ao mercado de uva *in natura*<sup>21</sup>.

Inúmeros fatores provindo de condições geográficas, biológicas e tecnológicas podem influenciar na qualidade e composição do vinho, entre eles, a água, aminoácidos, vitaminas, minerais e carboidratos<sup>15</sup>.

Os principais sais presentes nos vinhos são: os ânions minerais fosfato, sulfato, cloreto e sulfito e os cátions  $K^+$ ,  $Al^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cu^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Al^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ , os quais podem ser superficialmente detectados pela cor cinza dos vinhos ou mais profundamente, por técnicas mais avançadas<sup>22,23</sup>.

Encontram-se presente no vinho os compostos fenólicos responsáveis pela cor, adstringência e estrutura, sendo os taninos, as antocianinas e os ácidos fenólicos, os mais importantes. Entre os compostos nitrogenados presentes no vinho, é possível destacar as proteínas, os polipeptídios e os aminoácidos, sendo este último o principal constituinte<sup>24</sup>.

No que se refere à legislação, o decreto nº 8.198, de 20 de fevereiro de 2014, é a mais nova atualização da lei nº 7.678, de 08 de novembro de 1988, a qual regula sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho no Brasil<sup>25</sup>.

De acordo com o art. 275 do decreto nº 7.212, de 15 de junho de 2010, os vinhos e derivados da uva os quais serão produzidos para exportação, poderão ser elaborados, rotulados e denominados de acordo com as normas vigentes no país a qual se destina o produto, porém é proibida sua comercialização no Brasil<sup>26</sup>.

### 1.1.3 Origem e composição do chá

Os primeiros relatos do chá e suas propriedades medicinais datam de 2750 a. C.. De acordo com a lenda, o imperador chinês Shen Nung (o pai do chá) descansava embaixo de uma árvore nativa de chá, enquanto seu pote de água estava fervendo, ao acaso veio uma brisa e folhas da árvore caíram no seu pote de água. Posteriormente ele bebeu essa água, que estava com um gosto agradável e conta a lenda que em experiências posteriores

ele descobriu as propriedades benéficas do chá e divulgou entre os chineses o consumo da bebida<sup>27,28</sup>.

A chegada do chá na Europa foi em 1559, inicialmente comercializado por Portugal e Holanda e sua popularização na Inglaterra se deu no século XIX. No Brasil, as primeiras mudas de chá foram plantadas em 1814, no atual Jardim Botânico (antigo Real Horto)<sup>29</sup>.

Na China, inicialmente, as folhas verdes eram retiradas das árvores para fazer o chá, porém a bebida tinha um sabor amargo e, com o tempo, os chineses foram modificando o preparo dessas folhas para remover esse sabor. Até que descobriram um modo de produzir o chá preto (ou vermelho), deixando as folhas se oxidarem ao ar livre, até obter uma coloração cobre avermelhado, diminuindo assim a deterioração do chá, produzido principalmente para exportação. Até hoje, os chineses bebem do chá de folhas frescas<sup>27</sup>.

Inúmeros fatores contribuem para a variação da composição do chá, como o clima, espécie da folha, estação do ano, as condições de plantio e cultivo (tipo de solo, minerais, água e fertilizantes), tipo de processamento do chá e armazenamento. De modo geral é possível atribuir a sua composição os polifenóis totais, flavonoides (quercetina, kaempferol, miricetina), catequina (epigallocatequina-3-galato, epigallocatequina, epicatequina galato, galocatequina e epicatequina), aminoácidos, ácidos orgânicos (como o ácido gálico), compostos polifenólicos, proteínas, carboidratos, cafeína, alcalóides, antocianinas, minerais e compostos voláteis<sup>30-33</sup>.

No Brasil, a resolução RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005 estabelece o regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis. No seu tópico 2.2 o chá é definido como: "é o produto constituído de uma ou mais partes de espécie(s) vegetal(is) inteira(s), fragmentada(s) ou moída(s), com ou sem fermentação, tostada(s) ou não, constantes de Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás. O produto pode ser adicionado de aroma e ou especiaria para conferir aroma e ou sabor"<sup>34,35</sup>.

Na resolução RDC n. 267/2005, é previsto o uso das folhas e talos da espécie vegetal *Camellia sinensis* para o preparo de chá preto, chá verde ou chá branco<sup>36</sup>.

## 1.2 Revisão Bibliográfica

### 1.2.1 Polifenóis em vinhos

Na literatura, diversos trabalhos são publicados utilizando o vinho e o chá como fonte de estudos e diversas são as técnicas utilizadas pelos autores.

Mirnaghi e colaboradores aplicaram pela primeira vez em análise de alimentos um sistema de microextração em fase sólida (SPME) juntamente com cromatografia líquida acoplada a espectrometria massa/espectrometria de massa (LC-MS/MS) para obter um maior rendimento nas análises de polifenóis da baga, da uva e das amostras de vinhos. Os compostos analisados foram flavonóis, flavanóis, flavanona, estilbeno e ácidos fenólicos. A fase de extração sólida que mostrou melhor resultado foi composta por poliestireno-divinilbenzeno-poliacrilonitrilo (PS-DVB-PAN) com recuperações dos compostos fenólicos próximo a 100%, com exceção para a naringenina com recuperação de 80%. Em seguida, realizou-se uma análise com o LC-MS/MS com a fração livre dos analitos, resultando em concordância entre os dados com o SPME<sup>37</sup>.

Goldberg e colaboradores, utilizaram a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com detecção por arranjo de diodos (DAD), para determinar as concentrações de trihidroxiestilbenos (os isômeros cis e trans de polidatina e resveratrol), flavan-3-ols (catequina e epicatequina), flavonóides (quercetina e rutina), e o ácido hidroxip-cumárico. O método foi aplicado em 644 amostras de vinhos brancos das principais regiões produtoras de vinho do mundo. Os hidroxiestilbenos foram medidos na maioria dos vinhos, porém os isômeros cis do resveratrol e da polidatina foi detectado em poucas amostras. Os flavanóis foram principalmente encontrados nos vinhos Chardonnay da Austrália e Sauvignon Blanc da África do Sul. De um modo geral, não houve diferenças significativas entre os vinhos da França e da América do Norte. Para todas as análises realizadas as concentrações de polifenóis foram de 5% para vinhos brancos e de 25% para vinhos tintos<sup>37</sup>.

Cáceres-Mella e colaboradores estudaram a composição fenólica, o perfil de proantocianidina e a sensação gustativa resultante da mistura de vinhos Chilenos. O método analítico recomendado pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) foi utilizado para determinar o pH dos vinhos, conteúdo de açúcar, acidez e teor de etanol. O conteúdo de polifenóis totais foi obtido por absorção molecular na região do UV (expresso em termos de ácido gálico) e as proantocianidinas foram determinadas por HPLC-DAD. Após a mistura observou-se uma concentração menos variável entre o vinho principalmente para a espécie Carbenet Sauvignon. As proantocianidinas não diferiram nas

concentrações. A adstringência foi comum para as amostras analisadas, porém a sensação gustativa diferiu. Outros estudos são necessários para avaliar a melhor mistura para o consumidor final<sup>38</sup>.

Šeruga e colaboradores analisaram vinhos tintos elaborados em três diferentes regiões vinícolas da Croácia quanto ao conteúdo de polifenóis totais (PT), concentrações individuais de polifenóis e a atividade antioxidante (AA) dessas amostras. A quantidade de PT foi medida por voltametria de pulso diferencial, pelo método Folin-Ciocalteu e por HPLC. Verificou-se através da análise no HPLC, para os vinhos estudados, que os compostos polifenólicos mais abundantes foram o ácido gálico e (+)-catequina<sup>39</sup>.

Arcari e colaboradores analisaram amostras de vinhos brancos e tintos fortificados produzidos no Brasil, nas regiões do Planalto Catarinense, Serra Gaúcha e Região Carbonífera quanto ao seu teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante, minerais, álcoois superiores, cor e razão isotópica de carbono. As técnicas utilizadas para a análise foram: espectrofotometria (método Folin–Ciocalteu), a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia em fase gasosa (GC), eletroforese capilar de zona (CZE) e espectrometria de massa (MS) para determinação da razão isotópica<sup>40</sup>. Usando análise de componentes principais (PCA) foi separar os vinhos de acordo com a região de origem.

Ballus e colaboradores utilizaram eletroforese capilar de zona (CZE) para a separação simultânea de 16 compostos fenólicos presentes em vinhos rosé, tinto e branco. Os compostos separados foram narirutina, ácido caféico, ácido gálico, (-) - epicatequina, (+) - catequina, miricetina, rutina, canferol, trans -resveratrol, quercetina, morin, ácido cinâmico, ácido ferúlico, ácido 3,4- dihidroxibenzóico, ácido p -cumárico e ácido vanílico. A separação por CZE se mostrou eficiente conseguindo separar os compostos fenólicos. Para os vinhos brancos apenas alguns polifenóis foram encontrados e para os vinhos tintos os polifenóis em maiores concentrações foram o ácido gálico e a miricetina. Os resultados concordam com o que já foi apresentado na literatura<sup>41</sup>.

Granato e colaboradores determinaram a composição fenólica (polifenóis totais, flavonóides e antocianinas), a qualidade sensorial feita por sete provadores profissionais, o preço de varejo e a atividade antioxidante de 73 vinhos tintos da América do Sul do tipo *Vitis vinifera* de 5 variedades (Merlot, Malbec, Pinot Noir, Cabernet Sauvignon, e Syrah). A composição fenólica foi determinada individualmente por cromatografia líquida de alta performance acoplada com um sistema de díodos e detecção de fluorescência e seu teor total pelo espectrofotômetro utilizando o método Folin-Ciocalteu. O teor de flavonóides

totais foi determinado pelo método colorimétrico e o teor de antocianinas monoméricas foi determinado utilizando o método pH diferencial. Com as análises foi possível diferenciar estatisticamente os melhores vinhos por uma combinação de características sensoriais, preço e atividade antioxidante<sup>42</sup>.

Gris e colaboradores determinaram o teor de algumas antocianinas, flavonóides e não-flavanóides, ácido hidroxicinâmico e ácido hidroxibenzóico por HPLC- DAD e HPLC-DAD-MS e as atividades antioxidantes *in vivo* dos vinhos das uvas Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese e Syrah, das safras de 2006 e 2007, produzidos em São Joaquim e Santa Catarina no Brasil. O conteúdo fenólico e composição concordam com os vinhos da literatura. Sua aplicação *in vivo* mostrou que a composição fenólica é potencialmente favorável ao aumento da atividade antioxidante, podendo assim sua ingestão diária ser benéfica à saúde<sup>43</sup>.

Cetó e colaboradores construíram um biossensor enzimático eletrônico para a caracterização de 10 compostos fenólicos e determinação quantitativa de polifenóis totais em vinhos da Espanha a partir de medidas voltamétricas. Os métodos utilizados para comparação dos valores obtidos foram o Folin-Ciocalteu e o índice de polifenóis totais (I<sub>280</sub>). O método voltamétrico concordou com os resultados obtidos pelos dois métodos de referência, sendo uma alternativa útil ao método Folin-Cocalteu, reduzindo o tempo de análise, evitando pré-processamento de amostra e utilização de reagentes<sup>44</sup>.

Ainda existe uma grande variedade de artigos que analisam o teor de polifenóis totais ou individuais, porém existe a necessidade de oferecer métodos simples e rápidos a fim de fornecer esses resultados, pois quanto maior a concentração de polifenóis, maior será seu potencial antioxidante<sup>45</sup>.

### 1.2.2 Polifenóis em chás

Castro-López e colaboradores selecionaram diversos métodos de análise, já desenvolvidos, empregando HPLC e cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC) os quais foram utilizados e comparados para a análise da catequina e quercetina presente em chá branco, verde, vermelho e preto e em alguns alimentos. O sistema com detector de fotodiodos e com um detector de fluorescência, foram comparados com o espectrômetro de massa com armadilha de íons linear orbitrap (LTQ-Orbitrap-MS). O HPLC e UHPLC se mostraram eficientes na quantificação dos compostos, com tempo de resposta mais curto quando se utiliza a técnica de UHPLC. Os chás verde e branco

possuíram os maiores teores de catequina e quercetina, seguido dos outros tipos de chá e em menor quantidade os alimentos analisados. O método LTQ - Orbitrap - MS permitiu identificar outros analitos de interesse, nas amostras estudadas, além da catequina e quercetina <sup>46</sup>.

Yelena Sapozhnikov desenvolveu um método simples, rápido e de alto rendimento utilizando cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa (LC-MS/MS) para a determinação de uma ampla gama de compostos polifenólicos que representam diferentes classes de polifenóis, numa única análise. As análises foram aplicadas em amostras de chá verde, suco de uva e café. O preparo de amostra se baseou na abordagem "diluir e disparar". O método desenvolvido se mostrou eficiente conseguindo determinar diversos polifenóis de modo robusto, rápido e baixo custo. A taxa de análise fica em torno de 20 amostras por hora, fazendo filtração das amostras antes de fazer a medida. A taxa de recuperação aplicada em três diferentes níveis foi satisfatória, tornando o método uma alternativa útil para determinação de polifenóis<sup>48</sup>.

Jun e colaboradores empregaram um método de extração de pressão ultra-alta para extrair polifenóis de folhas de chá verde. Análise cromatográfica (HPLC) foi utilizada para determinar a concentração de quatro catequinas, ácido gálico e cafeína. Esse trabalho foi útil na hora de demonstrar que com extração em pressão elevada o tempo de extração por solvente orgânico reduz de 2 horas para 15 minutos vindo a ser útil na extração desses compostos do chá<sup>49</sup>.

Rostagno e colaboradores, desenvolveram um método de HPLC contendo um detector de arranjo de diodos acoplado em linha com um detector de fluorescência para determinar 19 ácidos fenólicos, flavonas, flavonóis, flavan-3-óis e cafeína. A técnica foi aplicada à amostras de chás preto, branco, verde, mate (*Ilex paraguariensis*), refrigerantes do tipo cola, café instantâneo e bebida energética os quais foram comprados no comércio local de Soria, na Espanha<sup>47</sup>. O método desenvolvido possui um limite de detecção na faixa de 0,5-211  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e limite de quantificação de 1,5-704  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . A concentração dos compostos analisados variou de 0,4-314  $\text{mg.L}^{-1}$  e dentre os compostos analisados aquele que apresentou maior concentração em todas as amostras foi a cafeína<sup>50</sup>.

Carloni e colaboradores realizaram análises utilizando HPLC, método Folin-Ciocalteu e outras técnicas referenciadas em artigos para determinar os fenóis totais, flavonóides, catequinas, teoflavinas, o teor de cafeína e atividade antioxidante de cinco diferentes chás: branco, verde (baixa cafeína e não descafeinado), preto (processamento tradicional, processamento CTC- Crush, Tear, Curl, ou Esmagamento, Rasgo e

Enrolamento) com o intuito de avaliar a relação entre fabricação e propriedades antioxidantes. Ensaios a cerca do perfil antioxidante foi obtido como chá verde  $\geq$  verde de baixa cafeína  $\geq$  branco  $\geq$  preto tradicional  $\geq$  preto CTC. Observou-se que a atividade quelante do metal se relaciona com o teor de teoflavinas e não com a atividade oxidante. O processo de fabricação influencia na atividade antioxidante do chá quando são controladas outras condições como região geográfica, condições ambientais, tipo de cultivar<sup>51</sup>.

Potrickos e colaboradores estudaram a variação da concentração de substâncias fenólicas totais presentes em diferentes marcas de folhas chá verde e erva mate obtidas no comércio da região sul do Brasil. A análise foi realizada a partir das infusões dos chás com o uso do método Folin-Ciocalteu que consiste na redução do reagente pelos polifenóis das amostras, resultando em um complexo de cor azul. As concentrações de fenóis totais para as amostras de erva-mate variaram entre  $25,3 \pm 6,3$  mg e  $65,5 \pm 2,6$  por 100ml de infusão aquosa, havendo diferença estatisticamente significativa entre as marcas analisadas, já para a infusão de chá verde nas 3 marcas analisadas não foi possível quantificar o teor de fenóis devido ao limite de detecção da mesma que deve ser inferior a 2 mg/100ml. Por outro lado, apesar da baixa quantidade de compostos fenólicos detectada na infusão de chá verde, dados da literatura sugerem alto potencial antioxidante das catequinas, comparável ao da vitamina E (tocoferol), as quais estão entre os principais componentes polifenólicos do chá verde<sup>48</sup>.

Claudia Anesini e colaboradores determinaram os teores de polifenóis totais (utilizando o reagente Folin-Ciocalteu) e a capacidade antioxidante *in vitro* de chá verde e preto, cultivado e industrializado na região Nordeste da Argentina. Foram analisados doze amostras de oito marcas diferentes. Os chás verdes mostraram um teor de polifenóis maior do que o chá preto em termos de ácido gálico e o mesmo perfil foi observado para a atividade antioxidante, onde a capacidade foi maior para o chá verde<sup>49</sup>.

Diversos são os trabalhos investigando o teor de polifenóis nos chás, porém no Brasil são poucos os trabalhos e a nível mundial assim como para o vinho, se requer uma técnica mais simples para fornecer esses dados. Pensando nessa necessidade, escolheu-se trabalhar com análise em fluxo, já que corresponde a uma técnica de baixo custo e alta velocidade de análise de amostras.

### 1.2.3 Análise em fluxo

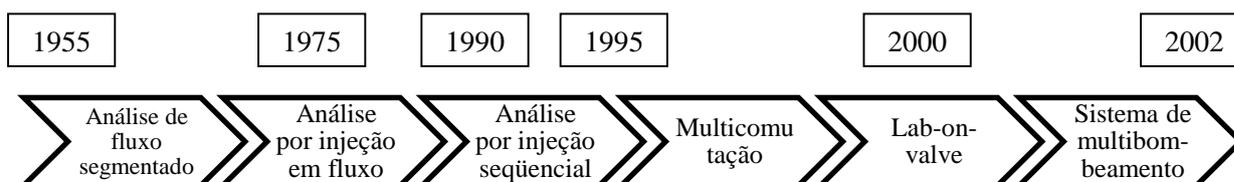
A técnica de análise química por injeção em fluxo começou em 1957, com Leonard T. Skeggs, onde foi descrito o desenvolvimento de um auto-analisador, que emprega a técnica conhecida no Brasil como análise em fluxo contínuo (CFA, do inglês, Continuous Flow Analysis) empregada para a determinação de uréia, cálcio e glicose em amostras biológicas<sup>50</sup>.

Em 1975, J. Ruzicka e Elo H. Hansen propuseram um novo conceito de análise em fluxo contínuo, a qual ficou conhecida como Flow Injection Analysis – FIA, cuja denominação em português é Análise por Injeção em Fluxo<sup>51</sup>.

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), FIA pode ser definido como uma análise em fluxo não segmentado por injeção da amostra em amostragem intermitente, enquanto que CFA consiste em fluxo segmentado por aspiração da amostra em amostragem intermitente<sup>52</sup>.

A maior parte dos experimentos iniciais que levaram ao desenvolvimento do FIA foram realizadas no Centro de Energia Nuclear para a Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP) e contou com a colaboração de pesquisadores brasileiros<sup>53</sup>.

Com o decorrer do tempo a análise em fluxo foi evoluindo e contribuindo cada vez mais para o desenvolvimento de métodos analíticos mais verdes, minimizando o consumo de reagentes e por consequência uma diminuição na geração de resíduos, sem afetar o desempenho analítico. A figura 4 mostra a evolução dos sistemas em fluxo com alguns exemplos<sup>54</sup>.



**Figura 4:** Evolução de acordo com o tempo da análise em fluxo.

O método de Multibombeamento por Análise em Fluxo foi desenvolvido em 2002. Nesta técnica, são utilizadas minibombas solenóides, onde o operador pode introduzir amostras e reagentes em quantidades diferentes já que é possível operá-las individualmente. As minibombas trabalham de modo pulsado, conferindo uma melhor mistura entre amostra e reagente, aumentando assim a sensibilidade do sistema e menor volume de resíduo gerado<sup>55,56</sup>.

Diante do exposto, vários trabalhos têm sido publicados com base em sistemas de análise em fluxo.

Molina-García e colaboradores desenvolveram um método para a determinação simultânea de reverastrol e piceid (precursor do resveratrol) em vinhos através do método fluorimétrico, utilizando o sistema de injeção em fluxo multicomutado para inserção da amostra e posterior detecção no espectrofluorímetro<sup>57</sup>.

Martins e colaboradores propuseram adaptar o método de redução dos íons de ferro (FRAP) a um sistema FIA e aplicando o design rotativo composto central (CCRD) para otimizar os parâmetros do sistema de análise. Após a otimização, o método foi utilizado para determinar a atividade antioxidante dos chás. O método proposto foi otimizado para diferentes parâmetros como taxa de fluxo do transportador, comprimento da alça de transporte e da bobina de reação. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de 28,6 e 86,8 pmol L<sup>-1</sup> de Fe<sup>3+</sup> e a precisão de 1,27%. Os resultados obtidos às amostras de chá com o método proposto foram equivalentes aos obtidos com o método convencional com um coeficiente de correlação de 0,9903, enquanto que para a atividade antioxidante não houveram diferenças significativas entre os métodos<sup>61</sup>.

Magalhães e colaboradores otimizaram um sistema colorimétrico adaptado ao FIA, com o objetivo de obter um método mais robusto para a determinação de flavonóides. O método analítico se baseia na reação entre Al<sup>3+</sup> e flavonóides em meio alcalino, com as condições reacionais sendo controladas. O mesmo foi aplicado a vinhos tintos, chás e infusões de ervas. O método utilizado permitiu a redução de tempo de análise da amostra de 12 min para 4 min, com elevada repetibilidade, desvio padrão relativo (RSD menor que 1,1%) e alta reprodutibilidade (RSD menor que 2,0%). Para o ensaio de adição e recuperação foi obtido a recuperação média de (+) - catequina e o desvio padrão relativo de 98 ± 2% e 99 ± 4% para o vinho tinto e o chá preto, respectivamente. Mostrando assim a eficiência do método com o uso do sistema FIA<sup>58</sup>.

Os trabalhos desenvolvidos por Páscoa e colaboradores<sup>59</sup> e Pais e colaboradores<sup>60</sup> empregaram análise por injeção sequencial (SIA) para a determinação enzimática do etanol em vinho. A determinação se baseou na reação envolvendo o álcool e o NAD<sup>+</sup> catalisada pela enzima álcool desidrogenase. Páscoa e colaboradores conseguiu desenvolver um método que concorda com métodos de referência diferindo pela menor geração de resíduo e menor consumo de reagente, além do tempo de determinação que teve um grande aumento. O segundo autor<sup>60</sup> obteve resultados semelhantes ao de Páscoa com o adicional estudo de efeito de matriz e com uma melhora em termos quantitativos em diminuição do consumo de amostra e reagente. Além disso ofereceu uma nova opção como uso para controle do processo de fermentação<sup>59,60</sup>.

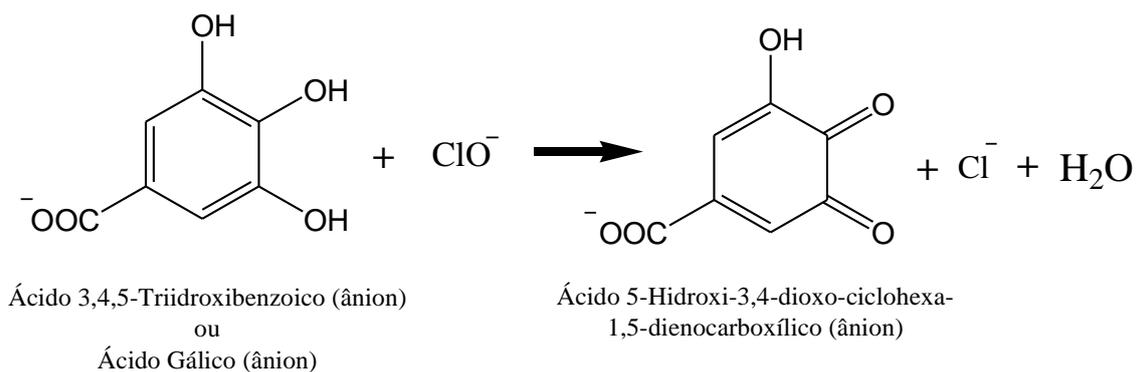
Silva e colaboradores, fez uso da análise em fluxo com detecção espectrofotométrica na determinação dos teores de sulfeto, sulfito e etanol em vinhos, envolvendo difusão gasosa através de uma membrana de Teflon, com o objetivo de propor uma nova técnica para avaliar a qualidade dos vinhos e controlar as fermentações e seleção da levedura. No sistema desenvolvido foi possível obter figuras de mérito com bons resultados, e o método foi aplicado sem tratamento prévio da amostra. Se mostrou versátil, robusto e adequado para aplicações em vinho e em melão<sup>61</sup>.

Cerdà e colaboradores propuseram a técnica de análise por injeção em fluxo baseada em multiseringas (MSFIA) para monitoramento da cinética de reações rápidas e que envolviam reagentes perigosos evitando a manipulação dos mesmos. A eficiência utilizando MSFIA em comparação aos sistemas clássicos em fluxo se baseia na utilização de duas câmaras de mistura eficientes e um motor que impulsiona uma barra que empurra as seringas e que fornecem tempos mortos de cerca de 20 ms. Bromo foi gerado e utilizado na bromação do ácido sulfúrico. Através da análise experimental foi possível verificar que o MSFIA pode ser utilizado para estudos cinéticos em reações químicas moderadamente rápidas já que os valores experimentais concordaram com os da literatura<sup>62</sup>.

Rocha e colaboradores desenvolveram um método em fluxo baseado em multicomutação com o uso de minibombas solenóides para determinação de ciclamato em adoçantes de mesa artificiais. A determinação do ciclamato se baseia na reação do analito com nitrito de sódio em meio ácido e a medição do excesso de reagente por iodometria. O limite de detecção foi de  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  com resposta linear até  $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ . Com o método proposto foi possível analisar 60 amostras por hora, gerando 2,0 mL de resíduo por determinação, sendo aplicado com sucesso à amostras de adoçantes com resultados que concordam com a literatura, não apresentando interferências até um nível de concentração 10 vezes maior que a concentração do ciclamato<sup>63</sup>.

Como pode ser observado nos trabalhos citados, a análise em fluxo sempre está acoplada a algum sistema de detecção e o mais amplamente utilizado é a espectrofotometria por ser mais simples e econômico<sup>64</sup>.

Nesse trabalho, buscou-se o desenvolvimento de um sistema em fluxo pulsado utilizando-se minibombas solenoide, para a determinação de polifenóis totais em vinhos tintos e chás verde e preto. A análise se baseia na reação dos compostos polifenólicos, expressos em termos de ácido gálico, reagindo com a solução de hipoclorito, gerando um produto colorido que instantaneamente se torna incolor, figura 5.



**Figura 5:** Reação proposta entre o ácido gálico e o íon hipoclorito.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um sistema em fluxo empregando reação flash para determinação de polifenóis totais em amostras de vinhos e chás, usando um detector *lab-made* operando na região do visível.

### 2.2 Objetivo Específico

Testar a reação entre ácido gálico e hipoclorito na bancada e determinar o comprimento de onda de máxima absorção da reação;

Desenvolver o módulo de análise do sistema automático em fluxo para a reação descrita;

Empregar a reação instantânea entre ácido gálico e hipoclorito no sistema, com detecção fotométrica;

Estudar as variáveis: solvente de diluição, pH e concentração do hipoclorito, número de pulsos, tempo de espera da leitura do sinal e outros;

Estabelecer as figuras de mérito do sistema;

Determinar o teor de polifenóis totais em chá e vinho.

## **3. Materiais e Métodos**

### *3.1 Reagentes e Soluções*

#### 3.1.1 Soluções Estoque

Preparou-se 200 mL de solução 2,0 mol L<sup>-1</sup> de ácido clorídrico (HCl, Merck, 37,0%) por diluição de 33,2 mL do ácido em 100 mL de água destilada. Após a solução esfriar, o volume foi completado em balão volumétrico.

Preparou-se 100 mL de solução 0,10 mol L<sup>-1</sup> de hidróxido de sódio (NaOH, Merck, 99%) por dissolução de 0,400 g do NaOH em 50 mL de água destilada. Após a solução esfriar, o volume foi completado em balão volumétrico.

Preparou-se 250 mL de solução 0,250 mol L<sup>-1</sup> de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Vetec, 99,5%) pH 11,0, dissolvendo-se 6,659 g do carbonato em água destilada e em seguida aferiu-se o volume em balão volumétrico. O ajuste do pH foi realizado com solução 2,0 mol L<sup>-1</sup> de HCl.

Preparou-se 100 mL de solução 1000 mg L<sup>-1</sup> de ácido gálico (C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>, Sigma-Aldrich, 98%) dissolvendo-se 0,1128 g do ácido gálico monohidratado em água destilada e o volume foi completado em balão volumétrico. Esta solução foi preparada diariamente.

Solução de hipoclorito de sódio 17,82 x 10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> foi preparada diariamente por diluição de solução branqueadora comercial (com teor de cloro ativo entre 2,0 e 2,5% v/v), previamente padronizada.

Preparou-se 200 mL de solução 0,1 mol L<sup>-1</sup> de borato de sódio ou tetraborato de sódio (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, Vetec, 99,5%) também conhecido como bórax, pH = 12, dissolvendo-se 4,01 g do reagente em água destilada e em seguida aferiu-se o volume em balão volumétrico. O ajuste do pH foi realizado com adição gradual da solução de hidróxido de sódio (NaOH), sendo a medida feita por pHmetro, até obter o pH desejado.

### 3.1.2 Padronização e preparo de soluções

#### 3.1.2.1 Hipoclorito de sódio

Para conhecer o teor de hipoclorito contido na água sanitária, efetuou-se a titulação redox da solução, utilizando as seguintes soluções:

- Tiosulfato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O, VETEC, 99%) – contendo 3 gotas de CHCl<sub>3</sub> para maior estabilidade da solução;
- 0,5% (m/v) de amido (VETEC);
- 10% (m/v) de iodeto de sódio (NaI, Reagen, 99,5 %);
- 5,6 mol L<sup>-1</sup> de ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH, VETEC, 99,5%);
- 4,0 mol L<sup>-1</sup> de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Merck, 95-97%).

Para padronizar a solução de S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>, foram pesados cerca de 20,0 mg de KBrO<sub>3</sub> (Merck), previamente seco à 110 °C por 2 horas e dissolvidos com 5 mL de água, em Erlenmeyer. Em seguida, foram adicionados 5 mL da solução de NaI e 10 mL de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, observando-se coloração marrom-castanho. Procedeu-se com a titulação

imediate, utilizando como titulante a solução de tiosulfato, até coloração amarelo-clara. Adicionou-se 5 mL da solução de amido ao Erlenmeyer, observando-se cor azul intensa da mistura, a adição de titulante continuou até a mudança da coloração para incolor.

Na segunda titulação, para determinar o teor de hipoclorito na água sanitária, repetiu-se o mesmo procedimento descrito no parágrafo anterior, substituindo-se a massa de  $\text{KBrO}_3$  por 5,00 mL de solução de água sanitária diluída na proporção 1:5 com água, e a solução de ácido sulfúrico por ácido acético.

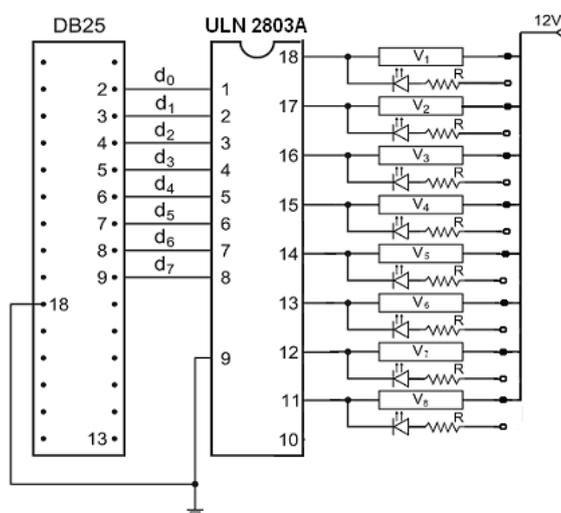
### 3.1.2.2 Ácido Gálico

Diluiu-se a solução estoque com volumes adequados de água, para preparar as soluções de trabalho com concentrações variando de 50 a 1000  $\text{mg L}^{-1}$ .

## 3.2 Sistema em fluxo

### 3.2.1 Descrição geral do sistema

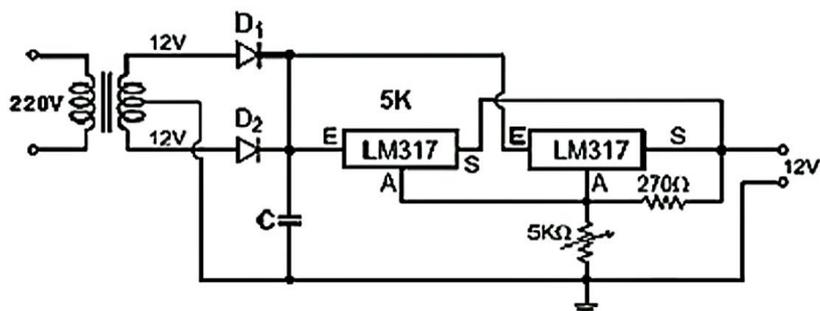
O sistema em fluxo foi composto por microcomputador AMD K6 366MHz, 128MB RAM, equipado com uma interface PCL-711 utilizada para realizar a aquisição do sinal analítico utilizando um programa escrito em QuickBasic 4.5. Uma interface eletrônica *lab-made* baseada no circuito integrado ULN2803A, foi acoplada à saída de impressora e utilizada para permitir o controle das minibombas através da porta paralela, figura 6.



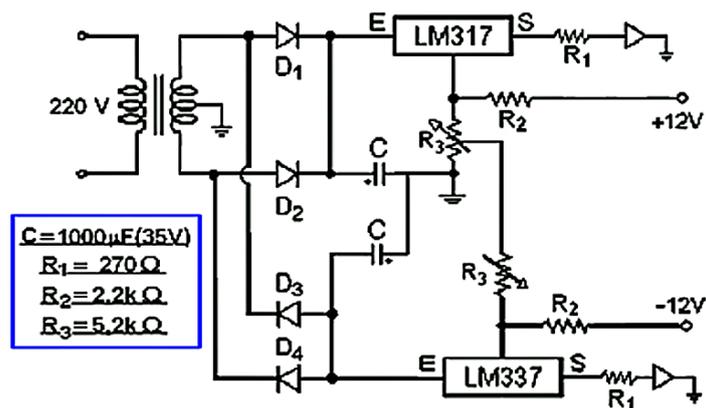
**Figura 6:** Interface eletrônica baseada no CI ULN2803 para controle das minibombas solenóides ( $V_x$ ) através da porta serial (DB25).

Fazia também parte do sistema duas minibombas solenóides (Bio-Chem. 090SP) e uma minibomba solenóide (Bio-Chem. 120SP) com volumes nominais de 8 e 20  $\mu\text{L}$  por pulso, respectivamente, as quais foram utilizadas para a amostra, reagente e transportador; linhas de transmissão feitas em politetrafluoretileno (PTFE ou Teflon®) de 0,8 mm de diâmetro interno; fonte de alimentação de 12 V constituída por um transformador 220 V/12 V de saída; dois diodos retificadores; um regulador de voltagem ajustável; capacitores eletrolíticos e resistores. A fonte foi construída sobre uma placa de circuito impressa para o acionamento das minibombas e do fotômetro, Figura 7a e 7b, respectivamente.

a)



b)



**Figura 7:** Fontes de alimentação para o acionamento (a) das minibombas e (b) para o fotômetro. LM337 e LM317 = reguladores ajustáveis de voltagem para negativo e positivo, respectivamente, E = entrada, S = saída, A = ajuste, Dx = diodos zener, C = capacitor, Rx = resistores.

A caixa metálica que apresentava as dimensões de 18 cm de comprimento, 5 cm de altura e 11 cm de profundidade, foi utilizada para comportar um fotômetro e uma cela de fluxo feita de vidro para a detecção fotométrica, figura 8.

a)

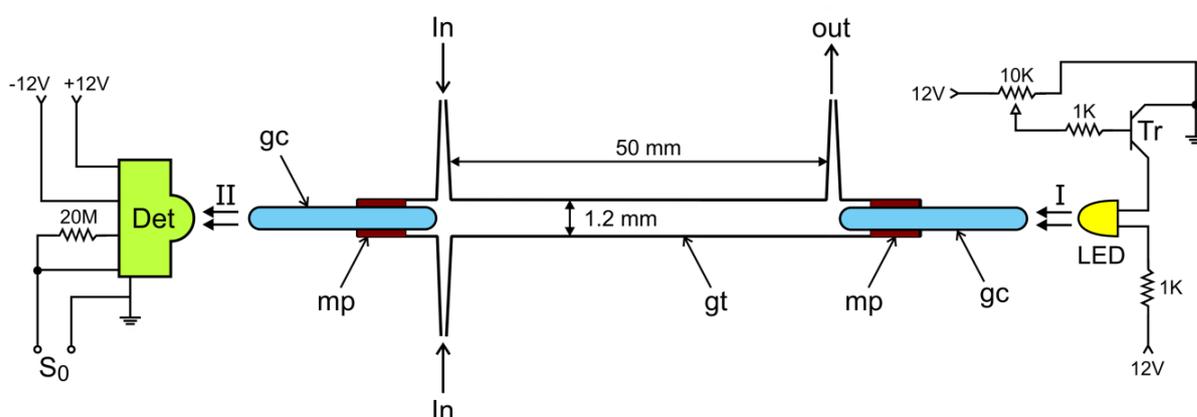


b)



**Figura 8:** Foto da caixa metálica (a) com a cela de fluxo e parte eletrônica (b).

O fotômetro foi construído no Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP) e é mostrado em detalhes na figura 9. Como pode ser observado, o fotômetro é constituído de uma cela de vidro (gt) de 50 mm de comprimento e 1,2 mm de largura, nas extremidades estão dois cilindros de vidro (guia de onda) com 20 mm de comprimento (mp), presos no cilindro por uma junção (gc). Em uma das extremidades tem-se um LED emitindo um feixe de radiação (I) com máximo de emissão de 490 nm e na outra tem-se o fotodetector (DET) que recebe o feixe de radiação após passar pela cela de fluxo.

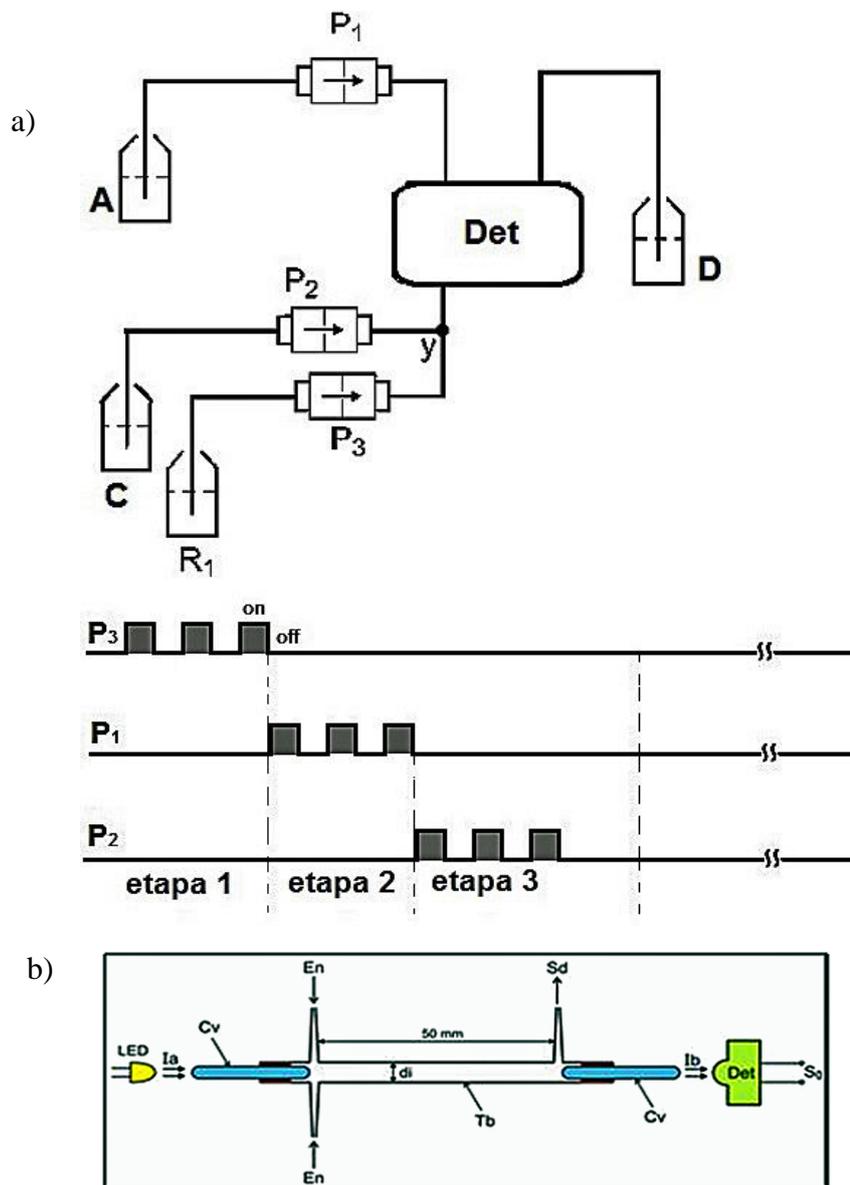


**Figura 9:** Cela de fluxo utilizada. Det = fotodetector OPT301;  $S_0$  = sinal em mV; gc – cilindros de vidro, comprimento de 20 mm e diâmetro menor de 1,2 mm; mp = junção do tubo no cilindro; gt = corpo da cela de fluxo, tubo de vidro (boro-silicato), diâmetro interno de 1,2 mm; In = entrada das soluções de amostras e hipoclorito ou  $H_2O$  e out = saída das soluções para o descarte; LED – diodo emissor de luz, 5 mm de

diâmetro, máximo de emissão 490 nm; Tr = transistor BC547; I = feixe de radiação emitido pelo LED; II = feixe de radiação chegando ao fotodetector (DET) após a transmissão através da cela de fluxo.

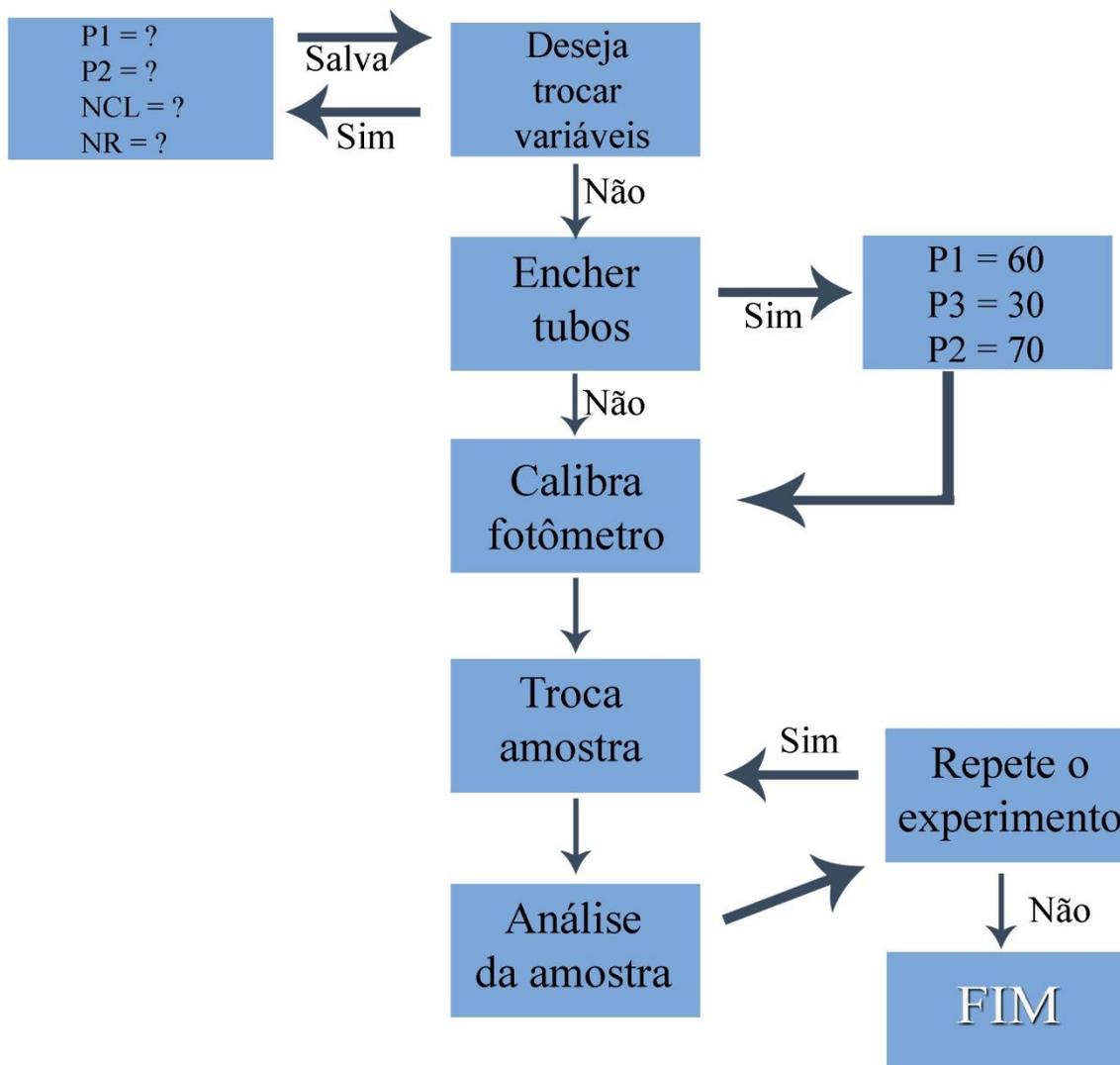
### 3.2.2 Descrição do módulo de análise

O módulo de análise do sistema em fluxo é mostrado na figura 10, é composto de 3 minibombas solenóides, para inserção de soluções de amostra, reagente e carregador, tubos de PTFE de 0,8 mm e conexão feita de acrílico.



**Figura 10:** a) Diagrama do sistema em fluxo utilizado na determinação de polifenóis. A = Amostra ou solução de referência; C = Solução transportadora ( $H_2O$ ); R1 = Solução de hipoclorito; Det = Detector (fotômetro), fonte LED a 490 nm; D = descarte; P1, P2, P3= minibombas solenóide; y: junção feita de acrílico. Posições ON e OFF representam as minibombas ligada e desligada, respectivamente. b) Cela de fluxo. En: entrada (amostra e hipoclorito); Sd: saída (descarte); Cv: guia de onda; Tb: tudo de vidro. Det: detector, OPT301.

O programa para acionamento das minibombas, aquisição e armazenamento de dados do sistema em fluxo foi escrito em linguagem Quick Basic 4.5 O fluxograma do programa, é apresentado na figura 11.



**Figura 11:** Fluxograma esquemático do programa escrito para o sistema em fluxo estudado, onde P1 = pulsos de padrão ou amostra, P2=pulsos do carregador ou transportador, P3 = pulsos de reagente, NLC= número de ciclos de leitura e NR= número de replicatas.

Inicialmente, o programa apresenta as variáveis P1 (pulsos de padrão ou amostra), P3 (pulsos do reagente), NCL (número de ciclos de leitura) e NR (número de replicatas), onde o usuário pode inserir novos valores ou no caso de já ter executado o programa deixar valores apresentados na tela. Em seguida, é mostrada a opção para encher os tubos das bombas P1, P3 e P2 com solução padrão/amostra, reagente e transportador (água destilada), respectivamente, onde o caminho óptico ficará preenchido com o transportador

para a reação. Na etapa posterior, o fotômetro é calibrado já que é utilizado um LED como emissor de luz. Em caso de inserção inicial com uma solução de amostra diferente daquela que se deseja analisar, ainda é possível trocar a amostra, em caso negativo, inicia-se a reação sendo acionada P3 (solução de hipoclorito) e depois P1, de acordo com a quantidade de pulsos indicado no início do programa. Esta sequência é repetida de acordo com o número de ciclos de leitura previamente estabelecido. A amostra entra em contato com o reagente já na cela de fluxo, no local onde está posicionado o detector, acontecendo assim a reação flash, sem a necessidade de mistura por um tempo maior para haver a formação do produto reacional. Após finalizado os ciclos de leitura, P2 é acionada e água é inserida no sistema para lavar o caminho reacional e é realizada a aquisição do sinal analítico. O número de replicatas (NR) informará ao sistema quantas vezes a análise será repetida. Ao final do programa surge a opção “repete o experimento”, em caso afirmativo será feita uma nova análise onde pode ser trocada ou não a amostra. Antes de finalizar o experimento, o sistema é lavado com água e em seguida com ar.

O sinal obtido no detector gera um gráfico na tela do computador através do sistema de transdução, fazendo com que seja possível acompanhar a reação em tempo real.

Para as minibombas empregadas, cada ciclo de acionamento corresponde ao volume de 4,5  $\mu\text{L}$  (solução de amostra e transportadora) e 20  $\mu\text{L}$  (solução de hipoclorito).

### *3.3 Estudo do comprimento de onda*

Realizou-se uma varredura do comprimento de onda para a reação proposta utilizando o espectrômetro *Ocean Optics*, para estabelecer o comprimento de onda da análise e o LED a ser utilizado no fotômetro.

### *3.4 Avaliação da vazão das minibombas*

Avaliou-se o volume inserido no sistema por cada minibomba solenóide para verificar se houve variação nos valores indicados pelo fabricante.

Para a análise, o sistema em fluxo foi preenchido com água destilada e em seguida bombeou-se 5, 10 e 20 pulsos individuais de cada minibomba, medindo-se a massa de água em replicata, recolhida em um pequeno frasco previamente seco.

Utilizou-se a densidade da água ( $d = m / v$ ) para encontrar o volume de água expelida, medindo-se e deixando estável a temperatura do ambiente.

### 3.5 Estudo do ruído do sistema

Realizou-se o monitoramento do sinal analítico utilizando água em todas as minibombas e do branco analítico que consistiu em substituir por água o reagente hipoclorito na minibomba P3. Essa verificação foi feita para avaliar como o sistema eletrônico se comporta diante de possíveis variações de tensão da energia elétrica, assim como a presença de radiação espúria, com e sem reação.

### 3.6 Estudo dos parâmetros do sistema em fluxo

#### 3.6.1 Estudo do solvente para o hipoclorito

Para verificar qual o melhor solvente da solução de hipoclorito neste sistema, prepararam-se soluções de hipoclorito diluídas nos seguintes solventes: ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) pH 5,2 e 6,5; solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) pH 9,2; solução de NaOH pH 10,2; e água pH 11.

Os sinais analíticos foram obtidos fixando-se a concentração de hipoclorito em  $3,56 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  e mantendo 10 pulsos de acionamento das minibombas para as soluções de reagente e amostra. Posteriormente, procedeu-se com a análise utilizando as soluções de NaOH,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  e tetraborato de sódio ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ).

#### 3.6.2 Estudo do pH da solução do hipoclorito

Visando estabelecer qual o melhor pH para a solução do hipoclorito de sódio, realizou-se a diluição do hipoclorito em solução de tetraborato de sódio com os valores de pH 9, 10, 11 e 12. Os valores de concentração do hipoclorito e pulsos das minibombas foram mantidos em  $3,56 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  e 10, respectivamente.

#### 3.6.3 Estudo da concentração do hipoclorito

Para avaliar qual a melhor concentração do hipoclorito, variou-se sua concentração na faixa de 3,56 a 32,08 ( $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ), mantendo-se constante o pH do

hipoclorito da solução, o solvente usado na diluição do mesmo e 10 pulsos para as soluções de reagente e da amostra.

### 3.6.4 Estudo do número de pulsos

Verificou-se o número de pulsos das minibombas utilizadas para a amostra e reagente, já que a quantidade dessas soluções pode influenciar na resposta da reação envolvida. Considerando que o caminho óptico já estava preenchido com a solução do reagente antes da inserção da solução da amostra, variou-se o número de acionamentos entre 5:5 (5 pulsos para a minibomba da amostra e 5 pulsos para a minibomba do reagente) a 20:20 (amostra:reagente). As demais variáveis já estudadas e selecionadas foram mantidas constantes.

### 3.7 Figuras de Mérito

Com o objetivo de validar o método proposto, após otimizar as diferentes variáveis do sistema, foram feitas análises para obter as seguintes figuras de mérito: linearidade, desvio padrão relativo das amostras, limite de detecção, e exatidão. Os parâmetros do sistema tais como, tempo de amostragem, quantidade de resíduo gerado, consumo por determinação de amostra e reagente também foram determinados.

O limite de detecção (LD), ou seja, a menor concentração de ácido gálico que pôde ser detectada foi calculada a partir de 20 medidas repetidas do branco (água) e do coeficiente angular da curva analítica, equação 1.

$$LD = 3,3 \frac{s}{a} \quad \text{Equação 1}$$

Onde: s = desvio-padrão da injeção de 20 soluções do branco analítico e a = coeficiente angular (slope) da curva analítica.

### 3.8 Amostras utilizadas e preparo

#### 3.8.1 Amostras de chá

Foram adquiridas 5 amostras de chá verde e preto de diferentes fabricantes, no comércio local da região metropolitana do Recife.

Para o preparo das amostras de chá, imergiu-se um sachê em cerca 100 mL de água deionizada a 95°C e deixou o mesmo sob infusão por 3 minutos, em seguida o sachê foi retirado e esperou-se o chá esfriar. Transferiu-se o chá para um balão de 100 mL e seu volume foi completado com água destilada. Posteriormente, o chá foi diluído 10 vezes com água.

### 3.8.2 Amostras de vinho

Foram adquiridas 9 garrafas de vinho tinto seco no comércio local da região metropolitana do Recife. As amostras de vinhos foram elaboradas na Argentina (Mendoza) e no Brasil (Rio Grande do Sul e Pernambuco), da uva Cabernet Sauvignon, das safras de 2009-2012 e com teor alcoólico variando de 12 a 14%.

As amostras de vinho foram diluídas 50 e 100 vezes com água destilada e em seguida procedeu-se as análises das mesmas.

## **4. Resultados e Discussão**

No sistema proposto, a reação entre hipoclorito de sódio e ácido gálico em meio alcalino é instantânea. No momento que as soluções estão em contato, o produto da reação é colorido (vermelho) mas, logo em seguida a solução fica incolor, por isso a reação foi denominada “reação flash” e foi monitorada na cela de fluxo.

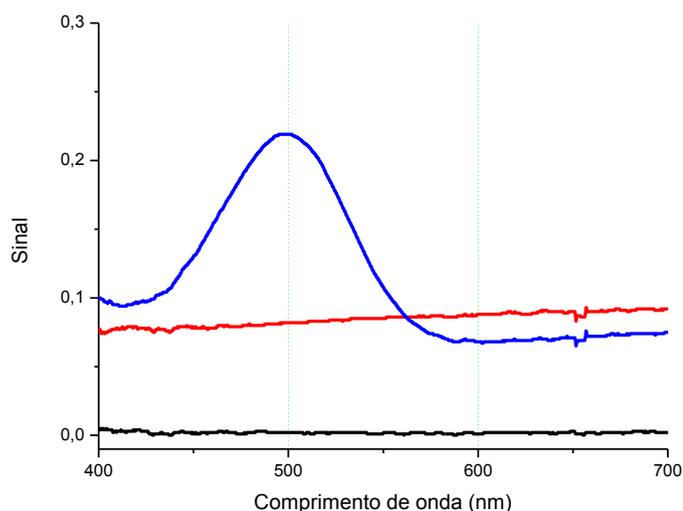
O hipoclorito oxida os compostos polifenólicos do vinho/chá ou ácido gálico usado como solução padrão em meio alcalino, como mostrado na Figura 5.

A estabilidade das soluções dos reagentes pode afetar a reação química com os compostos polifenólicos. Após realizar a titulação redox da solução de hipoclorito de sódio comercial, verificou-se que a mesma apresentava a concentração de  $3,56 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ .

#### 4.1 Estudo do comprimento de onda

O sistema em fluxo utilizado para esse trabalho possui LED como fonte de luz, assim, se fez necessário conhecer em qual comprimento de onda a reação teria maior absorvância.

Foi utilizado o espectrômetro *Ocean Optics* com o propósito de fazer uma varredura nos comprimentos de onda, onde é possível observar todos os comprimentos de onda ao mesmo tempo (figura 12) e como a reação é muito rápida (flash), seria inviável fazer a varredura em espectrômetros tradicionais que analisam um comprimento de onda por vez.



**Figura 12:** Gráfico de absorvância obtido para o ácido gálico (linha preta), água sanitária (linha vermelha) e ácido gálico em água sanitária (linha azul).

Com a varredura do comprimento de onda da reação entre ácido gálico e hipoclorito, verificou-se que o comprimento de onda máximo encontra-se em torno de 500 nm, com isso construiu-se o sistema com um LED de 490 nm.

#### 4.2 Avaliação da vazão das minibombas

O teste para avaliar o volume inserido com as minibombas solenóide foi feito na temperatura de 26 °C, onde a densidade da água é de 0,99681 g mL<sup>-1</sup>. A tabela 2 mostra os valores obtidos, após os devidos cálculos, onde o valor teórico de cada minibomba é indicado na tabela.

**Tabela 1:** Resultados obtidos para o cálculo do volume das minibombas e seu desvio padrão (SD).

| Minibomba                            | Pulsos | Média da massa<br>± SD (g) | Volume<br>(µL) | Volume/<br>pulso<br>(µL) | Média ± SD<br>(µL) |
|--------------------------------------|--------|----------------------------|----------------|--------------------------|--------------------|
| <b>P1</b> (amostra)<br>8 µL          | 05     | 0,0200 ± 0,0019            | 20,1           | 4,0                      | 4,4 ± 0,1          |
|                                      | 10     | 0,0454 ± 0,0003            | 45,5           | 4,5                      |                    |
|                                      | 20     | 0,0936 ± 0,0009            | 93,8           | 4,7                      |                    |
| <b>P2</b> (H <sub>2</sub> O)<br>8 µL | 05     | 0,0208 ± 0,0001            | 20,8           | 4,2                      | 4,5 ± 0,1          |
|                                      | 10     | 0,0436 ± 0,0014            | 43,7           | 4,4                      |                    |
|                                      | 20     | 0,0996 ± 0,0009            | 99,9           | 5,0                      |                    |
| <b>P3</b><br>(hipoclorito)<br>20 µL  | 05     | 0,0958 ± 0,0014            | 96,1           | 19,2                     | 19,9 ± 0,1         |
|                                      | 10     | 0,1999 ± 0,0007            | 200,6          | 20,1                     |                    |
|                                      | 20     | 0,4048 ± 0,0007            | 406,0          | 20,3                     |                    |

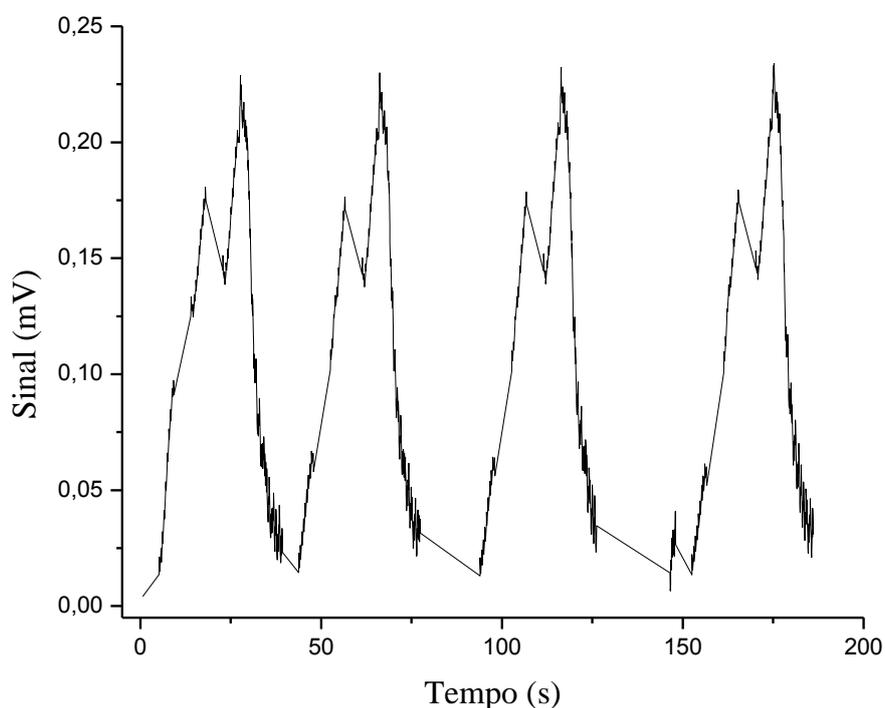
Observa-se que apenas a minibomba P3 está inserindo um volume correspondente ao valor indicado pelo fornecedor, essa diferença já era esperada, pelo fato das minibombas 1 e 2 já estarem desgastadas com o uso, enquanto que a P3 foi adquirida recentemente para ser utilizada nesse trabalho.

Com os valores obtidos, é possível quantificar a vazão de cada minibomba a partir dos volumes liberados e frequência de pulso especificada no programa do trabalho, logo

as vazões são:  $P1 = 66 \mu\text{L s}^{-1}$ ,  $P3 = 298,5 \mu\text{L s}^{-1}$  e como P2 não tem um valor único, já que o mesmo serve para lavagem, não se fez necessário o cálculo de sua vazão.

### 4.3 Funcionamento da metodologia em fluxo

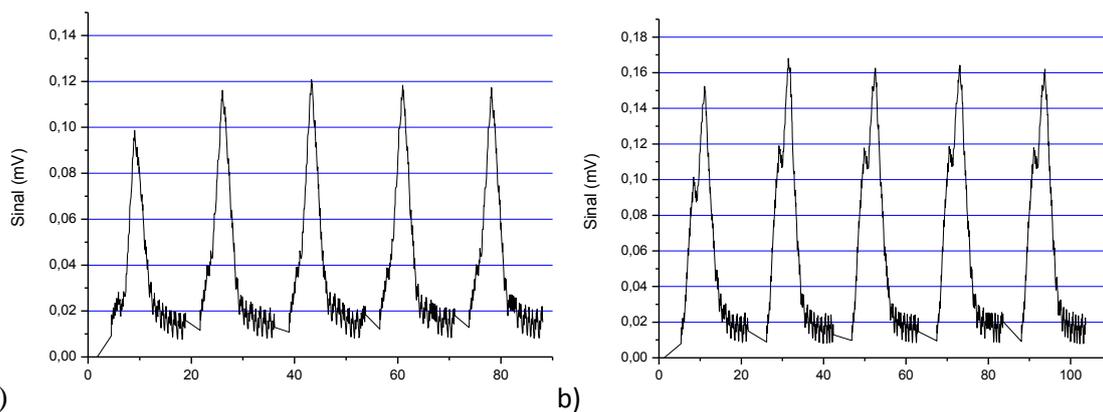
Utilizou-se neste teste as seguintes variáveis:  $P1 = 5$  ( $22 \mu\text{L}$ ),  $P3 = 5$  ( $100 \mu\text{L}$ ),  $NCL = 3$ ,  $NR = 4$ . Verificou-se desdobramentos no pico, ficando assim inviável um número de ciclos de leitura ( $NCL$ ) superior a 1, figura 13.



**Figura 13:** Sinal obtido no sistema para 3 ciclos de leitura ( $NCL = 3$ ) e 4 replicatas ( $NR = 4$ ) nas mesmas condições reacionais.

Os desdobramentos para  $NCL$  superior a 1 se justifica por se tratar de uma reação muito rápida, por isso denominada *reação flash*, onde o produto colorido é formado e imediatamente a reação fica incolor.

Estando estabelecido o número de ciclos se fazia necessário um valor inicial de tempo de acionamento de P1 e P3 e frequência com que funcionariam as minibombas. As variáveis foram  $P1 = 5$  ou  $10$ ,  $P3 = 5$  ou  $10$  e velocidade da minibomba 1 (mais lenta) ou 2 (mais rápida), figura 14.

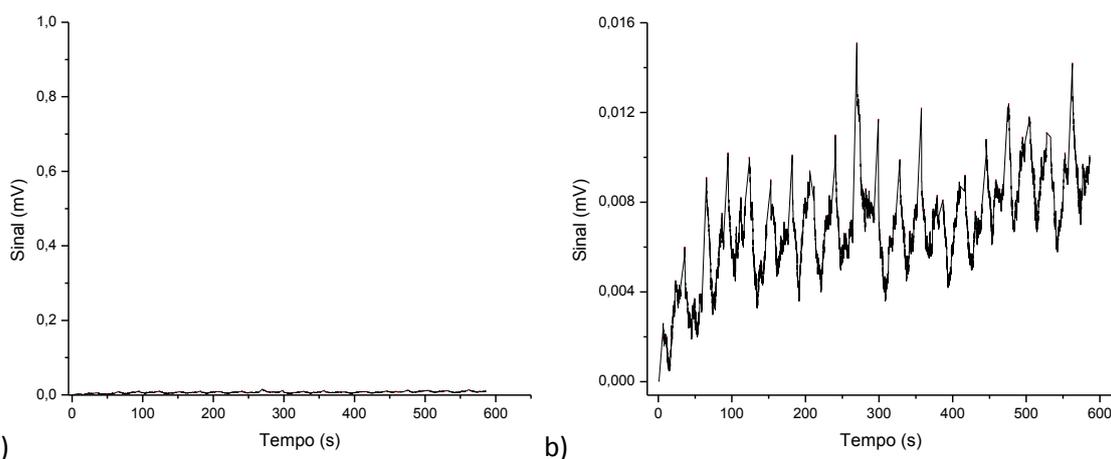


a) b)  
**Figura 14:** Sinais obtidos no sistema reacional com  $NCL=1$  e  $NR=5$  e concentração de ácido gálico de  $250 \text{ mg L}^{-1}$  a) P1 e P3 são mantidos na frequência de 5 pulsos. b) P1 e P3 são mantidos na frequência de 10 pulsos.

É possível verificar que o sinal obtido na figura 14 (b) embora apresente alguns “ombros” tem maior magnitude e foi selecionado em comparação com a figura 14 (a). Considerou-se também que se com 10 pulsos é possível aumentar o sinal, logo será provável aumentar a faixa de concentração de trabalho. Caso seja necessário trabalhar com concentrações menores, basta diluir a amostra.

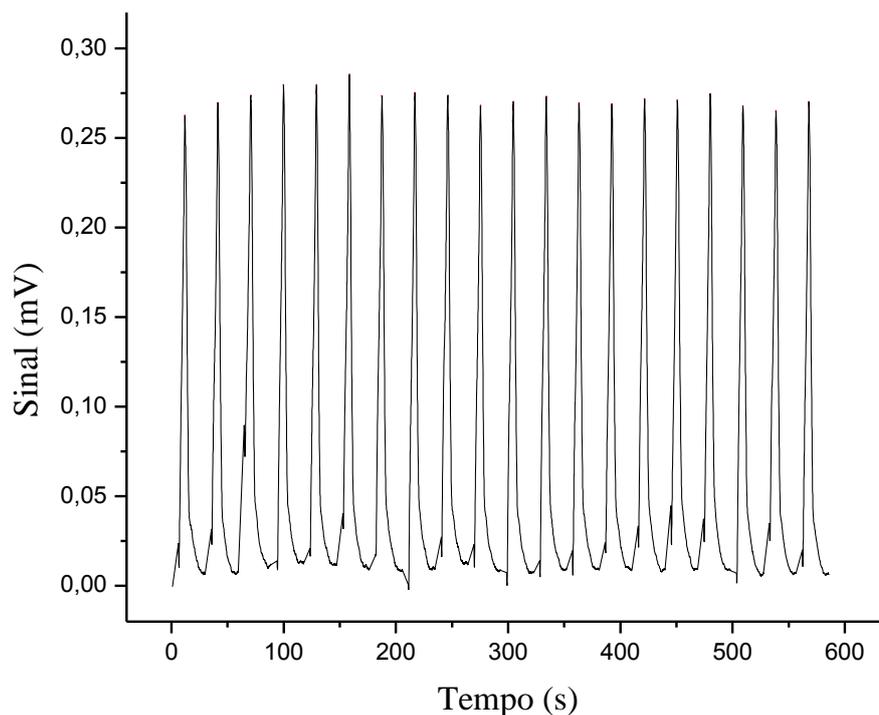
#### 4.4 Avaliação do ruído do sistema

Trabalhou-se com um sistema eletrônico e o mesmo estava sujeito a variações de tensão e presença de radiação espúria, pensando nisso, adicionou-se água em todo o sistema e executou-se o programa com 20 replicatas, figura 15. Observou-se um ruído instrumental em torno de  $0,015 \text{ mV}$ .



a) b)  
**Figura 15:** a) Ruído instrumental observado com a utilização de água em todas as minibombas b) Ampliação da escala de (a).

Realizou-se 20 medidas seguidas do sinal da solução contendo todos os reagentes e ácido gálico  $400 \text{ mg L}^{-1}$ , figura 16.



**Figura 16:** Avaliação da repetibilidade do método proposto. Ácido gálico 400 mg L<sup>-1</sup>.

Na figura 16 é possível verificar que a linha de base é estável, os sinais obtidos apresentam boa estabilidade o que demonstra a robustez do método proposto e a boa repetibilidade do método, obtendo-se um valor de desvio padrão relativo (RSD) de 1,93% ( $n = 20$ ).

#### 4.5 Estabilidade dos Reagentes

O estudo da estabilidade dos reagentes hipoclorito e ácido gálico, foi realizado em trabalho anterior <sup>65</sup> e verificou-se que ambas as soluções precisam ser preparadas no dia de trabalho.

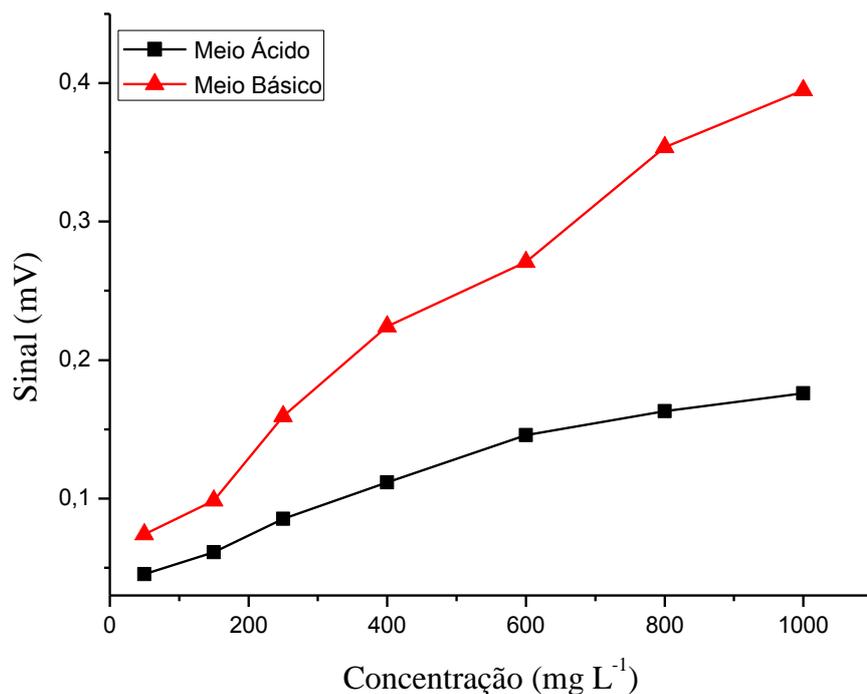
Avaliou-se a estabilidade do reagente hipoclorito quanto ao seu armazenamento e teor através da titulação da água sanitária e observou-se que houve estabilidade no seu teor em torno de 0,36 mol L<sup>-1</sup>, sendo avaliada a concentração da solução mantida armazenada sob refrigeração, durante 10 semanas.

O pH da solução de tetraborato de sódio, usado para realizar a titulação do hipoclorito, foi medido semanalmente, e observou-se boa estabilidade, tendo variação de cerca de 0,2 % (pH= 10,98) após um mês de preparo.

## 4.6 Estudo dos parâmetros do sistema em fluxo

### 4.6.1 Estudo do solvente para o hipoclorito

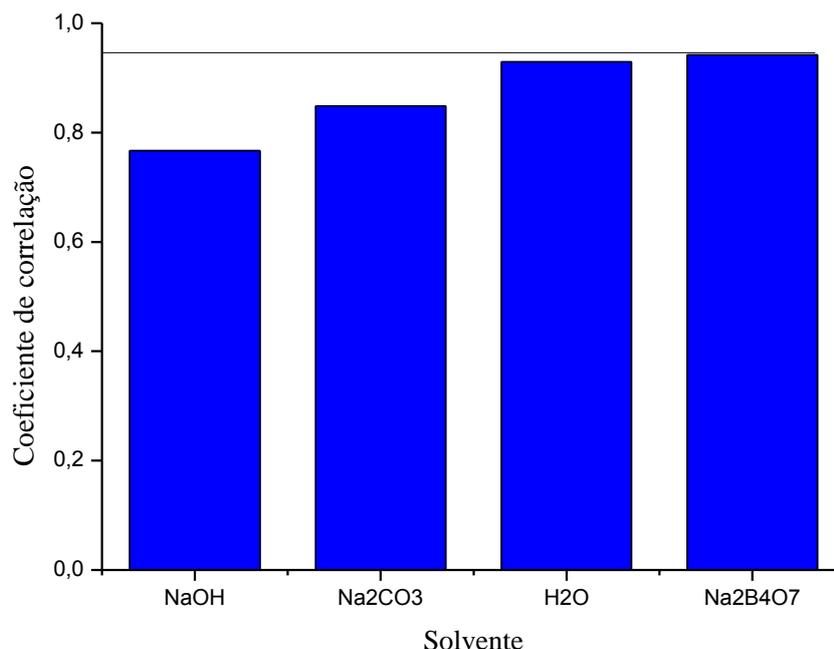
Buscando o melhor meio reacional para preparar a solução de hipoclorito, analisou-se a curva analítica usando solventes em meio ácido e básico e a média dos resultados podem ser observados na figura 17.



**Figura 17:** Curva analítica obtida na faixa de concentração de 50 a 1000 mg L<sup>-1</sup> de ácido gálico para avaliar o solvente (ácido ou básico) do hipoclorito.

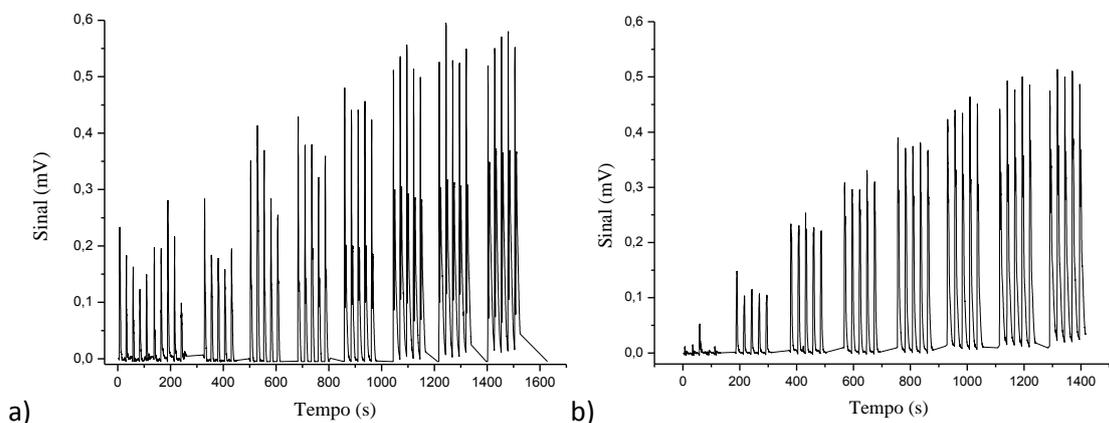
Os coeficientes de correlação e coeficiente angular obtidos foram 0,98 e 0,06 para o meio básico e de 0,96 e 0,05 para o meio ácido, respectivamente. Com base nesses resultados observou-se que o meio básico é melhor para se trabalhar, visto que possuía um sinal maior e a reta obtida mais próxima de 45° o que implica num maior coeficiente de correlação.

Analisou-se as soluções de hidróxido de NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, todos em pH 11 buscando qual o melhor solvente para o hipoclorito, os resultados são mostrados na figura 18.



**Figura 18:** Comparação dos coeficientes de correlação obtidos para diferentes solventes, em meio alcalino, da solução de hipoclorito: NaOH, H<sub>2</sub>O (pH 11), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.

Escolheu-se trabalhar com o Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, pois seu coeficiente de correlação foi o maior entre todos os solventes utilizados em meio básico, além disso, observou-se que com o uso do tampão bórax os sinais da reação eram mais reprodutíveis, já com água que possuía um coeficiente de correlação próximo do bórax havia uma variação maior dos sinais para uma mesma medida, figura 19.

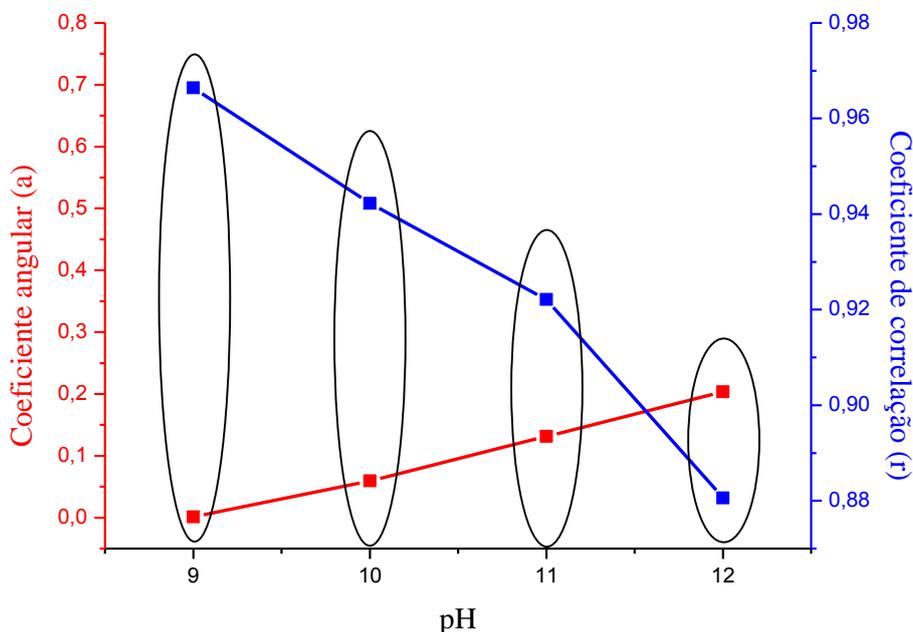


**Figura 19:** Sinais obtidos no sistema para a concentração de 0-100 mg L<sup>-1</sup> de ácido gálico variando-se o solvente do hipoclorito. a) Água (pH 11) como dissolvente do hipoclorito com o sinal do branco sendo repetido por 10 vezes. b) Tampão carbonato.

Em ambos os gráficos, a programação utilizada foi: P1=10, P2=10, NCL=1, NR=5 com concentração de hipoclorito de  $3,56 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>.

#### 4.6.2 Estudo do pH da solução do hipoclorito

O hipoclorito de sódio foi dissolvido em solução de tetraborato de sódio no pH 9, 10, 11 e 12, figura 20. Utilizou-se as mesmas condições reacionais: P1=10, P2=10, NCL=1, NR=5 com concentração de hipoclorito de  $3,56 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ .



**Figura 20:** Respostas obtidas do coeficiente de correlação (r) e angular (a) da curva analítica em função da variação do pH na solução de hipoclorito.

Os coeficientes de correlação (r) são muito próximos, logo, resolveu-se avaliar o valor do coeficiente angular (a) para buscar o melhor pH combinando os resultados de "r" e "a". O maior valor de "a" é para o pH 12, porém ele possui um "r" em torno de 0,88 o qual pode ser considerado baixo se for comparado com o pH 11, que possui "r" maior que 0,92 e um coeficiente de correlação diferindo em menos de 0,1. Embora os demais valores de pH apresentem "r" elevados, os valores de "a" decrescem se forem observados os outros valores de pH e em especial o pH 9 que possui maior "r", porém com o valor de "a" zero. Assim, optou-se por trabalhar com o pH 11.

#### 4.6.3 Estudo da concentração do hipoclorito

Os resultados obtidos quando a concentração de hipoclorito foi variada na faixa de  $3,56$  a  $32,08$  ( $\times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ), são apresentados na tabela 3. Onde foram mantidas constantes as condições até então estudadas, utilizando o tampão tetraborato de sódio no pH 11 como solvente do hipoclorito.

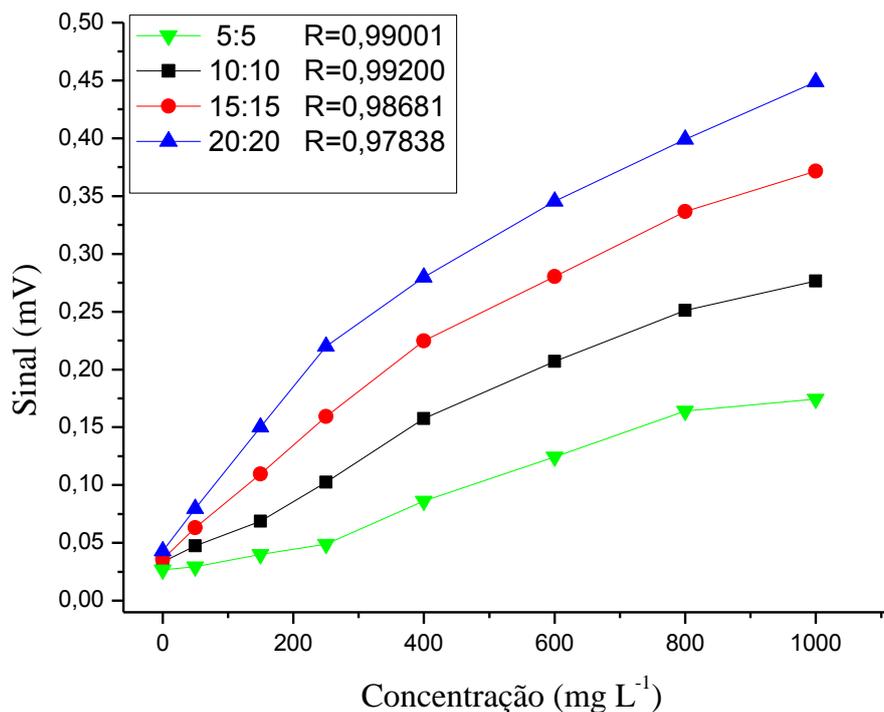
**Tabela 2:** Valores obtidos de coeficiente de correlação e coeficiente angular em função da concentração do hipoclorito.

| Hipoclorito ( $\times 10^{-2}$ mol L <sup>-1</sup> ) | Coeficiente de Correlação (r) | Coeficiente Angular (a) |
|--|-------------------------------|-------------------------|
| 3,56   | 0,9744                        | 0,04                    |
| 7,13   | 0,9962                        | 0,05                    |
| 17,82  | 0,9986                        | 0,04                    |
| 26,73  | 0,9959                        | 0,02                    |
| 32,08  | 0,9885                        | 0,03                    |

Os coeficientes de correlação são bem próximos, logo, aliou-se o resultado de "r" com o coeficiente angular (a). Ao examinar a tabela acima, é possível verificar que o maior "a" é para a concentração de 7,13, porém o maior "r" é para 17,82, com isso selecionou-se a concentração de 17,82 para trabalhar, pois possui um "r" maior e seu "a" é próximo a concentração de 7,13, logo a pequena diminuição no "a" é compensada pelo ganho na linearidade da análise.

#### 4.6.4 Estudo do número de pulsos

Na figura 21 são mostradas as respostas obtidas para cada número de pulsos de amostra e reagente utilizado para avaliar qual seria a melhor quantidade de pulsos a ser utilizada no trabalho, variando de 5 até 20 pulsos. Optou-se pelo número de pulsos 15:15 (amostra:reagente), pois apesar de possuir um "r" menor, o sinal analítico obtido com ele aumenta. Já o sinal 20:20 foi descartado por possuir o menor sinal de "r", logo a menor linearidade e um gasto bem maior de reagentes o que não compensa o aumento de seu sinal que proporcionalmente pouco difere do seu antecessor. As condições de trabalho foram: NR= 5, NCL=1, concentração de hipoclorito de  $17,82 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>, preparado com tampão bórax no pH 11.



**Figura 21:** Estudo do número de pulsos de amostra e reagente.

Os melhores resultados dos estudos realizados para o sistema em fluxo desse trabalho estão resumidos na tabela 4, os quais foram utilizados para a determinação de polifenóis presentes nos chás e vinhos analisados.

**Tabela 3:** Parâmetros selecionados para o sistema em fluxo proposto.

| Parâmetro   | Condições estudadas                     | Condições selecionadas |
|---|---|------------------------|
| Solvente para ClO <sup>-</sup>  | Água, hidróxido, carbonato, tetraborato | Tetraborato de sódio   |
| pH  | 9,0 – 12,0                              | 11,0                   |
| Concentração de ClO <sup>-</sup><br>(10 <sup>-2</sup> mol L <sup>-1</sup> ) | 3,56 – 32,08                            | 17,82                  |
| Número de pulsos<br>(Amostra:Reagente)                                      | 5:5-20:20                               | 15:15                  |

#### 4.7 Figuras de Mérito

Após a otimização do sistema em fluxo, verificou-se alguns parâmetros para validar a metodologia proposta. A linearidade do método foi obtida através da construção de curvas analíticas obtendo equação da reta, onde a faixa linear para o ácido gálico foi de 50-1000 mg L<sup>-1</sup>.

A precisão do método foi obtida realizando 20 medidas consecutivas das absorvâncias para a solução padrão de ácido gálico na concentração 400 mg L<sup>-1</sup> e amostras de chá preto, chá verde e vinho tinto. Os resultados são mostrados na tabela 5, e observa-se desvios padrão relativo (%), logo repetibilidade, variando de 1,0 a 1,9 %. Foram analisadas as soluções de ácido gálico em dias diferentes, obtendo-se a reprodutibilidade do método, que foi de 8,5%. O limite de detecção (LD) foi de 21 mg L<sup>-1</sup>.

O consumo de soluções de reagente e amostras foram medidos a partir dos valores de injeção para cada minibomba e são mostrados na tabela 5.

**Tabela 4:** Figuras de mérito obtidas para a metodologia.

| <b>Parâmetro</b>  | <b>Valor</b> |
|---|--------------|
| Linearidade (mg L <sup>-1</sup> )                         | 50 – 1000    |
| Desvio padrão relativo (RSD) (%) <sup>ác. gálico</sup>    | 1,9          |
| Desvio padrão relativo (RSD) (%) <sup>chá preto</sup>     | 1,8          |
| Desvio padrão relativo (RSD) (%) <sup>chá verde</sup>     | 1,0          |
| Desvio padrão relativo (RSD) (%) <sup>vinho</sup>         | 1,7          |
| Limite de detecção (mg L <sup>-1</sup> )                  | 21           |
| Limite de quantificação (mg L <sup>-1</sup> )             | 62           |
| Frequência analítica (determinação h <sup>-1</sup> )      | 120          |
| Resíduo gerado por determinação (mL)                      | 0,97         |
| Consumo de amostra por determinação (μL) <sup>chá</sup>   | 6,6          |
| Consumo de amostra por determinação (μL) <sup>vinho</sup> | 0,3          |
| Consumo de hipoclorito por determinação (μL)              | 298,5        |

a, b, c, dDesvio padrão relativo (n = 20) de solução de ácido gálico 400 mg L<sup>-1</sup>, chá preto, verde e vinho tinto, respectivamente.

#### 4.8 Interferentes

Substâncias interferentes são aquelas que causam uma variação maior que 5% em módulo, do sinal de uma solução de referência. Com base nisso, estudou-se o efeito de

possíveis interferentes os quais fazem parte da composição de vinho e de chá. Essas substâncias foram adicionadas a uma solução de referência de ácido gálico em diferentes concentrações e suas variações são mostradas na tabela 6.

**Tabela 5:** Níveis de tolerância para possíveis interferentes no vinho e chá.

| <b>Substância</b>             | <b>Concentração no<br/>vinho (mg L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Concentração no<br/>chá (mg L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Variação no sinal<br/>(%)</b> |
|-------------------------------|--|--|----------------------------------|
| Ácido ascórbico               | 40   | 2,0  | - 5,0                            |
| Ácido cítrico                 | 1,8  | 0,1  | - 2,9                            |
| SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | 530  | 26   | - 1,9                            |
| SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> | 451  | 26   | + 1,4                            |
| Fe <sup>2+</sup>              | 4,8  | 0,2  | + 7,9                            |
| Mn <sup>2+</sup>              | 87   | 4,4  | - 1,9                            |
| Al <sup>3+</sup>              | 20   | 1,0  | - 5,7                            |
| Cu <sup>2+</sup>              | 2,0  | 0,1  | - 4,1                            |

Destes compostos, os potenciais interferentes no vinho são os íons Fe<sup>2+</sup> e Al<sup>3+</sup> os quais causam uma variação de sinal de +7,9 e -5,7 %, respectivamente. Entretanto, os teores de ferro e alumínio no vinho, normalmente, são menores do que 4,8 mg L<sup>-1</sup> e 20 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente<sup>66,67</sup>, desta forma, não haverá interferência desses íons no método proposto.

No chá, embora não se encontre na literatura muitos trabalhos com o produto brasileiro. Ao analisar os trabalhos de outros países verificou-se que os teores de alumínio e ferro apresentam teores que variam de 0,2 a 1 mg L<sup>-1</sup> (tabela 7), respectivamente. Em alguns trabalhos os autores encontraram quantidades superiores a estas, as quais são influenciadas pela forma de extração das folhas<sup>68-72</sup>.

Considerando que para os chás, a concentração dos íons presentes na amostra é equivalente à estudada, poderia haver interferência gerando aumento ou diminuição do sinal analítico. Porém, como o alumínio contribui negativa e o ferro positivamente, poder-se-ia sugerir, em média, que eles não interferem devido ao efeito antagônico. Para os chás que possuem quantidade de ferro e alumínio inferiores ao estudado o método pode ser

aplicado adequadamente pois a variação de sinal é inferior a 5 % o que é considerado aceitável.

#### 4.9 Análise das amostras

Para avaliar o efeito de matriz nas amostras, foi realizado teste de adição e recuperação, comparando-se os resultados obtidos das concentrações de ácido gálico nas amostras de vinho tinto e chá com e sem adição de ácido gálico.

Os resultados das concentrações de polifenóis representados como ácido gálico, são mostrados na Tabela 7. No teste de adição e recuperação, as adições foram de 100 e 300 mg L<sup>-1</sup> de ácido gálico.

**Tabela 6:** Resultados das concentrações de ácido gálico obtidos nas amostras de chá e vinho analisados e % de recuperação para as adições de 100 e 300 mg L<sup>-1</sup> de ácido gálico.

| <b>Amostra</b>  | <b>Concentração (mg L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Adição (mg L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Recuperação (%)</b> |
|-----------------|---|-----------------------------------|------------------------|
| V1 <sup>a</sup> | 184 ± 7                                 | 100                               | 75 ± 5                 |
|                 |   | 300                               | 96 ± 3                 |
| V2 <sup>b</sup> | 252 ± 14                                | 100                               | 104 ± 2                |
|                 |   | 300                               | 94 ± 7                 |
| V3 <sup>b</sup> | 268 ± 7                                 | 100                               | 136 ± 4                |
|                 |   | 300                               | 101 ± 4                |
| V4 <sup>a</sup> | 197 ± 10                                | 100                               | 99 ± 4                 |
|                 |   | 300                               | 95 ± 1                 |
| V5 <sup>a</sup> | 274 ± 6                                 | 100                               | 90 ± 3                 |
|                 |   | 300                               | 74 ± 10                |
| V6 <sup>a</sup> | 149 ± 5                                 | 100                               | 86 ± 1                 |
|                 |   | 300                               | 91 ± 1                 |
| V7 <sup>a</sup> | 293 ± 35                                | 100                               | 89 ± 1                 |
|                 |   | 300                               | 98 ± 5                 |
| V8 <sup>a</sup> |   | 100                               | 82 ± 3                 |

|                 |              |     |                 |
|-----------------|--------------|-----|-----------------|
|                 | $280 \pm 15$ | 300 | $83 \pm 2$      |
| V9 <sup>a</sup> | $84 \pm 7$   | 100 | $95 \pm 4$      |
|                 |              | 300 | $107 \pm 2$     |
| C1              | $36 \pm 2$   | 100 | $118 \pm 3$     |
|                 |              | 300 | $101 \pm 3$     |
| C2              | $358 \pm 36$ | 100 | $124 \pm 2$     |
|                 |              | 300 | $96 \pm 1$      |
| C3              | $493 \pm 32$ | 100 | $118 \pm 1$     |
|                 |              | 300 | $87,0 \pm 0,3$  |
| C4              | $444 \pm 25$ | 100 | $104,0 \pm 1,5$ |
|                 |              | 300 | $85,3 \pm 0,4$  |
| C5              | $424 \pm 13$ | 100 | $121 \pm 4$     |
|                 |              | 300 | $94 \pm 1$      |

V1 a V9: amostras de vinho; C1 a C5 amostras de chá diluída 1:10 (v/v)

a: amostra diluída 1:100 (v/v);

b: amostra diluída 1:50 (v/v).

Os resultados mostram valores de recuperação média de  $96,2 \pm 10,4\%$  para vinhos e  $101,9 \pm 7,3\%$  para chás. Estes valores indicam que o procedimento proposto pode ser usado como uma alternativa para o controle de qualidade de amostras de vinho e chá.

## 5. Conclusão

No sistema estudado obteve-se que o máximo de absorção na reação entre ácido gálico e hipoclorito se deu no comprimento de onda de 490 nm.

Construiu-se um módulo de análise com o uso de programa em linguagem Quick Basic para aplicação da reação flash.

O sistema proposto permite determinar a quantidade de polifenóis totais expressos em termos de ácido gálico com a reação *flash* entre hipoclorito e ácido gálico que produz instantaneamente cor e em seguida descolore, medindo o sinal no fotômetro.

O método proposto permitiu a determinação de polifenóis na faixa de 62 a 1000 mg L<sup>-1</sup> com limite de detecção de 21 mg L<sup>-1</sup> de ácido gálico e recuperação que variou média de 96,2 ± 10,4% para vinhos e 101,9 ± 7,3% para chás.

O método preenche requisitos da Química verde, pois empregou pequenos volumes de soluções, gerando pequeno volume de resíduo por determinação (0,97 mL). Ainda como vantagem observa-se a elevada frequência analítica de 120 determinações por hora.

Além de relativamente simples o método é robusto, versátil e não envolve tecnologia sofisticada e dispendiosa.

## Referências

- (1) GILBERT, D. L. *Oxygen and living processes: an interdisciplinary approach*;

- Springer, Ed.; New York, 1981.
- (2) CARRASCO, C.; HOLGUÍN-ARÉVALO, M. S. .; MARTÍN-PARTIDO, G.; RODRÍGUEZ, A. B. .; PARIENTES, J. A. *Mol. Cell. Biochem.* **2014**, *387*, 217–225.
  - (3) HUANG, Dejian; OU, Boxin; PRIOR, R. L. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1841–1856.
  - (4) OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M. O. F. et. al. *Quimica Nova.* **2009**, *32*, 689–702.
  - (5) SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-Jr, G. M. et. al. *Quimica Nova* **2007**, *30*, 351–355.
  - (6) CABRITA, M. J.; SILVA, J. R.; LAUREANO, O. *I Seminario Internacional de Vitivinicultura.* **1999**, 61–102.
  - (7) DÔRES, R. G. *Tese apresentada na Universidade de Viçosa sob o título: Análise Morfológica e fitoquímica da fava d'anta.*; 2007.
  - (8) MOCHIZUKI, M.; YAMAZAKI, S.; KANO, K.; IKEDA, T. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1569*, 35–44.
  - (9) RIBÉREAU-GAYON, P. .; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. *Handbook of enology. The chemistry of wine and stabilisation and treatments*; Chichester, J. W. & S., Ed.; 2th Ed.; 2006; Vol. 2.
  - (10) MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. *Quim. Nov.* **2008**, *31*, 1218–1223.
  - (11) RAMDANI, D.; CHAUDHRY, A. S.; SEAL, C. J. *Journal of agricultural and food chemistry.* **2013**, *61*, 4961–4967.
  - (12) ANISSI, J.; EL HASSOUNI, M.; OUARDAOUI, A.; SENDIDE, K. *Food Chemistry.* **2014**, *150*, 438–447.
  - (13) YAMAMOTO, T.; JUNEJA, L. R.; CHU, D.; KIM, M. *Chemistry and Applications of Green Tea*; CRC.; New York, **1997**.
  - (14) ARRIBAS, A. S.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, M.; CHICHARRO, M. *Trends Anal. Chem.* **2012**, *34*, 78–96.
  - (15) AMARANTE, J. O. *Vinhos do Brasil e do mundo para conhecer e beber.* Summus, Ed.; 6th ed.; São Paulo, **1983**.
  - (16) PACHECO, A. O. *Iniciação à enologia.* 3ª ed.; São Paulo, **2000**.
  - (17) MIRANDA, F. *Arte e Vinho*; Axcel Books, 1ª ed.; Rio de Janeiro, 2001.
  - (18) Embrapa Semi-árido. Disponível em: [www.cpatosa.embrapa.br](http://www.cpatosa.embrapa.br). Acessada em

- 18/03/2014.
- (19) Codevasf. Disponível em: [www.codevasf.gov.br/osvales](http://www.codevasf.gov.br/osvales). Acessada em 18/03/2014.
- (20) Disponível em: <http://www.valedosaofrancisco.com.br>. Acessada em 18/03/2014.
- (21) Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2012. Disponível em: [http://www.uvibra.com.br/dados\\_estatisticos.htm](http://www.uvibra.com.br/dados_estatisticos.htm). Acessado em 16/03/2014.
- (22) HASHIZUME, T. Tecnologia do Vinho. In: AQUARONE, E; BORZANI, W; SCHAMIDELL, W; LIMA, U.A. *Biotechnologia Industrial: Biotechnologia na produção de alimentos*. São Paulo: Editora Edgard Blücher, v.4, p.21-68, **2001**.
- (23) BURIN, V. M.; FALCÃO, L. D.; CHAVES, E. S. .; GRIS, E. F.; PRETI, L. F.; BORDIGNON, M. T. L. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2010**, *45*, 1505–1512.
- (24) PINTO, D. *Manual Didático do Vinho: Iniciação à Enologia*; Anhembi Morumbi; **2008**.
- (25) Decreto nº 8.198, de 20 de fevereiro de 2014. Regulamenta a Lei no 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho. Diário Oficial da República Federativa do Brasil.
- (26) Decreto nº 7.212, de 15 de Junho de 2010. Regulamenta a cobrança, fiscalização, arrecadação e administração do Imposto sobre Produtos Industrializados - IPI. Diário Oficial da República Federativa do Brasil.
- (27) PETTIGREW, J. *Chá – Vip para o Homem que Quer Saber Mais*; Nobel, 1ª Ed.; **1999**.
- (28) HARBOWY, M. E.; BALENTINE, D. A. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **1997**, *16*, 415–480.
- (29) GRACINDO, I. *Viagem ao Mundo do Chá - Tao Te Cha*; Palavra, C. da, 1ª Ed.; **2013**.
- (30) GRAHAM, H. N. *Prev. Med. (Baltim)*. **1992**, *21*, 334–350.
- (31) FIRMINO, L. de A. Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, **2011**.
- (32) SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; CARDOSO, C., *et.al. Brazilian J. Pharm. Sci.* **2007**, *43*.
- (33) Disponível em: <http://www.tocklai.net/activities/tea-chemistry/>. Acessado em 19/03/2014.
- (34) Disponível em:

- [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/res0277\\_22\\_09\\_2005.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/res0277_22_09_2005.html)  
. Acessado em 20/03/2014.
- (35) Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/regutec.htm>.  
Acessado em 20/03/2014.
- (36) Disponível em:  
[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e2ad670047457e3d8a4ade3fbc4c6735/RDC\\_267\\_2005.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e2ad670047457e3d8a4ade3fbc4c6735/RDC_267_2005.pdf?MOD=AJPERES). Acessado em 20/03/2014.
- (37) GOLDBERG, D. M.; KARUMANCHIRI, A.; SOLEAS, G. J.; TSANG, E. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1999**, *50*, 185-193.
- (38) CÁCERES-MELLA, A.; PEÑA-NEIRA, A.; AVILÉS-GÁLVEZ, P.; MEDELMARABOLÍ, M.; DEL BARRIO-GALÁN, R.; LÓPEZ-SOLÍS, R.; CANALS, J. *M. J. Sci. Food Agric*. **2014**, *94*, 666–676.
- (39) ŠERUGA, M.; NOVAK, I.; JAKOBEK, L. *Food Chem*. **2011**, *124*, 1208–1216.
- (40) ARCARI, S. G.; CHAVES, E. S.; VANDERLINE, R.; ROSIER, J. P.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. *Food Res. Int*. **2013**, *53*, 164–173.
- (41) BALLUS, C. A.; MEINHART, A. D.; de OLIVEIRA, R. G. GODOY, H. T. *Food Res. Int*. **2012**, *45*, 136–144.
- (42) GRANATO, D.; KATAYAMA, F. C. U.; CASTRO, I. A. *Food Chem*. **2011**, *129*, 366–373.
- (43) GRIS, E. F.; MATTIVI, F.; FERREIRA, E. A.; VRHOVSEK, U.; WILHELM-FILHO, D.; PEDROSA, R. C. .; BORDIGNON-LUIZ, M. T. *J. Food Compos. Anal*. **2013**, *31*, 31–40.
- (44) CETÓ, X.; CÉSPEDES, F.; del VALLE, M. *Talanta* **2012**, *99*, 544–551.
- (45) CURVELO-GARCIA, A. S. *Controlo de qualidade dos vinhos. Química Enológica: métodos analíticos*. Lisboa.
- (46) CASTRO-LÓPEZ, M. D. M.; LÓPEZ-VILARIÑO, J. M.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M. V. *Food Chem*. **2014**, *150*, 119–127.
- (47) ROSTAGNO, M. A.; MANCHÓN, N.; D'ARRIGO, M.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; RAMOS, A.; MARTÍNEZ, J. A. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *685*, 204–211.
- (48) POTRICKOS, R.; KLETCKE, V. *Rev. Interdiscip. Estud. em Saúde*. **2013**, *1*, 27–38.
- (49) ANESINI, C.; FERRARO, G. E.; FILIP, R. *J. Agric. Food Chem*. **2008**, *56*, 9225–9229.

- (50) SKEGGS, L. T.; Hochstrasser, H. *Clinical Chemistry*. **1964**, *10*, 918–936.
- (51) ZAGATTO, E. A. .; REIS, B. F.; OLIVEIRA, C. C.; SARTINI, R. P.; ARRUDA, M. A. Z. *Anal. Chim. Acta*. **1999**, *400*, 249–256.
- (52) VAN DER LINDEN, W. E. *Pure Appl. Chem*. **1994**, *66*, 2493–2500.
- (53) REIS, B. F. *Quimica Nova*. **1996**, *19*, 51–58.
- (54) MELCHERT, W. R.; REIS, B. F.; ROCHA, F. R. P. *Anal. Chim. Acta*. **2012**, *714*, 8–19.
- (55) FORTES, P. R.; FERES, M. A.; SASAKI, M. K.; Alves, E. R.; ZAGATTO, E. A. G. .; PRIOR, J. A. V.; SANTOS, J. L. M.; LIMA, J. L. F. C. *Talanta*. **2009**, *79*, 978–983.
- (56) DIAS, A. C. B.; SNTOS, J. L. M.; LIMA, J. L. F. C.; QUINTELLA, C. M.; LIMA, A. M. V.; ZAGATTO, E. A. G. *Anal. Bioanal. Chemitry*. **2007**, *388*, 1303–1310.
- (57) MOLINA-GARCÍA, L.; RUIZ-MEDINA, A.; CÓRDOVA, M. L. F. *Anal. Chim. Acta*. **2011**, *689*, 226–233.
- (58) MAGALHÃES, L. M.; ALMEIDA, M. I. G. S.; BARREIROS, L.; REIS, S.; SEGUNDO, M. A. *Food Anal. Method* **2012**, *5*, 530 – 539.
- (59) PÁSCOA, R. N. M. J.; VIDIGAL, S. S. M. P.; TÓTH, I. V.; RANGEL, A. O. S. *S. J. Agric. Food Chem*. **2006**, *54*, 19–23.
- (60) PAIS, T. F. M. .; VIDIGAL, S. S. M. P. .; TÓTH, I. V. .; RANGEL, A. O. S. S. *Food Control*. **2013**, *30*, 616–620.
- (61) SILVA, C. R.; GOMES, T. F.; BARROS, V. A. F.; ZAGATTO, E. A. G. *Talanta* **2013**, *113*, 118–122.
- (62) CERDÀ, V.; UBIDE, C.; ZURIARRAINB, J. J. *Braz. Chem. Soc*. **2012**, *23*, 1989–1996.
- (63) ROCHA, F. R. P.; RÓDENAS-TORRALBA, E.; MORALES-RUBIO, Á.; GUARDIA, M. D. La. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *547*, 204–208.
- (64) TROJANOWICZ, M. *Flow injection analysis: Instrumentation and applications*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., **2000**.
- (65) ANDRADE, M. F.; ASSIS, S. G. F.; PAIM, A. P. S.; REIS, B. F. *Food Anal. Methods* **2013**.
- (66) JOS, A.; MORENO, I.; GONZÁLEZ, A. G.; REPETTO, G.; CAMEÁN, A. M. *Talanta* **2004**, *63*, 377–382.
- (67) KMENT, P.; MIHALJEVIČ, M.; ETTLER, V.; ŠEBEK, O.; STRNAD, L.; ROHLOVÁ, L. *Food Chem*. **2005**, *91*, 157–165.

- (68) FUNG, K. F.; CARR, H. P.; POON, B. H. T.; WONG, M. H. *Chemosphere* **2009**, 75, 955–962.
- (69) MCKENZIE, J. S.; JURADO, J. M.; de PABLOS, F. *Food Chem.* **2010**, 123, 859–864.
- (70) EEDEN, T. S. V.; JANA, O.; SYMINGTON, E. A.; JONKER, C. Z.; RAMPEDI, I. T. *S Afr J Sci* **2012**, 108, 1–7.
- (71) KARAK, T.; BHAGAT, R. M. *Food Res. Int.* **2010**, 43, 2234–2252.
- (72) WELNA, M.; SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; POHL, P. *Food Res. Int.* **2013**, 53, 922–930.