

CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA MULTIVARIADA DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE VINHOS

Wellington César Gallice, Iara Messerschmidt e Patricio Peralta-Zamora*

Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, CP 19081, 81531-980 Curitiba - PR, Brasil

Recebido em 31/3/10; aceito em 7/10/10; publicado na web em 26/1/11

MULTIVARIATE SPECTROSCOPIC CHARACTERIZATION OF ANTIOXIDANT POTENTIAL OF WINE. In this work the antioxidant capacity of red wine samples was characterized by conventional spectroscopic and chromatographic methodologies, regarding chemical parameters like color, total polyphenolic and resveratrol content, and antioxidant activity. Additionally, multivariate calibration models were developed to predict the antioxidant activity, using partial least square regression and the spectral data registered between 400 and 800 nm. Even when a close correlation between the evaluated parameters has been expected many inconsistencies were observed, probably on account of the low selectivity of the conventional methodologies. Models developed from mean-centered spectra and using 4 latent variables allowed high prevision capacity of the antioxidant activity, permitting relative errors lower than 3%.

Keywords: wine; antioxidant potential; multivariate electronic spectroscopy.

INTRODUÇÃO

Estudos relativamente recentes demonstram que, mesmo adepto a uma dieta rica em gorduras, o povo francês apresenta uma baixa incidência de doenças coronárias, assim como uma baixa tendência à obesidade.¹ Este fato, universalmente conhecido como o paradoxo francês, é atribuído ao consumo diário de vinho, produto que, em função da sua rica composição em espécies polifenólicas, exerce um importante efeito antioxidante.²

Grande parte das reações metabólicas do organismo humano é realizada em meio aeróbico (ex. respiração mitocondrial), o que irremediavelmente leva à geração de inúmeras espécies reativas de oxigênio (EROs), com destaque para radicais peroxila (ROO[•]), alcóxila (RO[•]), hidroxila (HO[•]), superóxido (O₂[•]) e oxigênio singlete (¹O₂), dentre outras. Normalmente, o organismo controla a concentração deste tipo de espécies, principalmente por meio da produção de enzimas que catalisam reações de inativação de radicais.³ Contudo, o aumento da geração intracelular de radicais ou a deficiência nos mecanismos antioxidantes podem desequilibrar este sistema de controle,⁴ produzindo o denominado estresse oxidativo. Em geral, estima-se que o estresse oxidativo esteja envolvido na incidência de inúmeras doenças, dentre as quais se podem destacar câncer, arteriosclerose, reumatismo, artrite, artrose e doenças degenerativas, como Parkinson e Alzheimer, dentre outras.

Em função da comprovada relação existente entre o estresse oxidativo e o surgimento de patologias características, grande ênfase tem sido dada nos últimos anos ao consumo de alimentos que apresentem atividade antioxidante. Dentro deste contexto, destaque deve ser dado ao vinho, principalmente tinto, produto que apresenta elevada ação antioxidante, em razão da presença de altas concentrações de substâncias polifenólicas, como taninos, ácidos fenólicos, flavonoides, catequinas e antocianidinas.⁵ Mesmo que a composição polifenólica dos vinhos seja altamente dependente do tipo de uva, das condições climáticas, das técnicas de cultivo e produção e da forma de armazenamento, estima-se que todos os tipos de vinho exerçam uma importante ação protetora contra doenças cardiovasculares e degenerativas.⁶

Dentro do extenso grupo de espécies fenólicas responsáveis pela ação antioxidante do vinho, tem sido dado destaque ao resveratrol (*trans*-3,5,4'-tri-hidroxistilbeno), um estilbeno que apresenta vários efeitos biológicos de relevância, com destaque para a atividade anticâncer e cardioprotetora.⁷

A avaliação do potencial antioxidante de vinhos pode ser realizada pela quantificação de uma substância específica (ex. resveratrol), pela quantificação de uma família de substâncias (ex. polifenóis totais) ou pela avaliação da capacidade antioxidante frente a uma espécie radicalar padrão. De maneira geral, o teor de resveratrol é determinado por cromatografia em fase líquida, usualmente utilizando-se injeção direta.⁸ Por sua vez, o teor de espécie polifenólicas totais costuma ser determinado espectrofotometricamente, utilizando-se, por exemplo, o reagente de Folin-Ciocalteu.⁹ A capacidade antioxidante pode ser determinada por vários métodos disponíveis. Entretanto, as técnicas mais frequentemente empregadas envolvem a inativação de espécies radicalares, usualmente o radical cátion ABTS^{•+}, resultante da reação entre ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e persulfato de potássio.¹⁰

Embora uma importante parcela da atividade antioxidante de vinhos seja atribuída à presença de espécies polifenólicas, grande parte das quais apresenta absorção característica na região espectral compreendida entre 400 e 800 nm, não existem relatos na literatura sobre a avaliação deste parâmetro recorrendo-se à espectroscopia eletrônica. Sendo assim, o presente trabalho apresentou como principal objetivo avaliar a capacidade antioxidante de vinhos, utilizando dados espectrais e procedimentos de calibração multivariada fundamentados em regressão por mínimos quadrados parciais (PLS).

PARTE EXPERIMENTAL

Amostras de vinho

Grande parte das 47 amostras de vinho tinto (Tabela 1) foi adquirida em supermercados, distribuidoras de bebidas e adegas da região (Curitiba-PR). Outras foram gentilmente doadas pelas vinícolas Miolo (RS), Garibaldi (RS) e Campo Largo (PR).

*e-mail: zamora@quimica.ufpr.br

Tabela 1. Descrição das principais características dos vinhos tintos utilizados no estudo

Amostra	Vinícola	Uva	Ano	Nacionalidade
A01	Do Avô	Mistura	2006	Brasil
A02	Carta Nueva	Cabernet Sauvignon	2008	Chile
A03	Diego del Valle	Carmenere	2000	Chile
A04	Franco Italiano	Mistura - Colonial	2008	Colombo-Brasil
A05	Salton Classic	Merlot	2007	Brasil
A06	Aurora Varietal	Pinot Noir	2008	Brasil
A07	Chalet Du Clermont	Mistura	2005	Brasil
A08	Acquasantiera	Cabernet Sauvignon	2005	Brasil
A09	Santa Carolina - Reservado	Cabernet Sauvignon	2007	Chile
A10	Miolo (Campos de Cima)	Merlot	2008	Brasil
A11	Miolo (Campanha Gaucha)	Merlot	2008	Brasil
A12	Santa Florentina	Malbec	2007	Argentina
A13	Santa Helena	Cabernet Sauvignon	2007	Chile
A14	Santa Florentina	Cabernet Sauvignon	2007	Argentina
A15	Miolo (Vale dos Vinhedos)	Merlot	2008	Brasil
A16	Saint Germain	Merlot	2008	Brasil
A17	Vinãs de Alvear	Malbec	2008	Argentina
A18	Da Casa - Garibaldi	Isabel e Bordo	2008	Brasil
A19	Marcus James	Tannat	2008	Brasil
A20	Trapiche	Malbec	2007	Argentina
A21	Etchart	Malbec	2006	Argentina
A22	Meridien 68	Cabernet Sauvignon	2008	Argentina
A23	Caballo Negro	Carmenere	2007	Chile
A24	Trimento Tribu	Pinot Noir	2007	Chile
A25	Santa Helena	Malbec	2007	Argentina
A26	Trivento Tribu	Tempranillo	2007	Argentina
A27	Evolucion	Merlot	2006	Chile
A28	Solar del Paso	Tannat	2007	Uruguai
A29	Caballo de Oro	Syrah	2005	Chile
A30	Vapores 1888	Cabernet Sauvignon	2005	Brasil
A31	Baccio	Cabernet Sauvignon	2006	Brasil
A32	Trapiche	Merlot	2007	Argentina
A33	Leonardo Falcone	Tannat	2004	Uruguai
A34	Carta Vieja	Cabernet Sauvignon	2007	Chile
A35	Norton	Bonarda	2006	Argentina
A36	Terrasul	Cabernet Sauvignon	2004	Brasil
A37	Norton	Barbera	2007	Argentina
A38	Colina del Vale	Mistura	2008	Brasil
A39	Terranova	Shiraz	2006	Brasil
A40	Trapiche	Malbec	2008	Argentina
A41	Espirito de Chile	Carmenere	2007	Chile
A42	Castilo de Liria	Bobal&Shiraz	2005	Espanha
A43	Latitud 33	Syrah	2007	Argentina

Tabela 1. Continuação

Amostra	Vinícola	Uva	Ano	Nacionalidade
A44	Santa Helena	Malbec	2007	Argentina
A45	Veneto	Merlot	2006	Itália
A46	Calvet	Merlot	2005	França
A47	Obikwa	Shiraz	2006	África do Sul

Caracterização espectroscópica

Espectros na região do visível (400-800 nm) foram registrados num espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-2401PC, empregando cela de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm. As amostras de vinho foram diluídas em água destilada (diluição de 10 vezes), filtradas em membrana de acetato de celulose (0,45 µm) e medidas diretamente.

A partir dos dados espectrais foram calculados o índice de cor (IC, Equação 1) e a tonalidade (T, Equação 2), de acordo com metodologia descrita por Glories e citada por Castillo-Sánchez.¹¹

$$IC = Ab. 420 \text{ nm} + Ab. 520 \text{ nm} + Ab. 620 \text{ nm} \quad (1)$$

$$T = Ab. 420 / Ab. 520 \quad (2)$$

Determinação cromatográfica de resveratrol

Resveratrol foi determinado por cromatografia em fase líquida de alta eficiência, de acordo com procedimento descrito por Souto e colaboradores,⁸ utilizando-se cromatógrafo Waters equipado com coluna C18 (4,6 x 150 mm, partícula de 5 µm) e detector por arranjo de fotodiodos. A eluição foi realizada no modo gradiente, utilizando-se metanol:ácido acético:água na proporção 10:2:8 (Fase A) e 90:2:8 (Fase B). A eluição seguiu a programação 100 a 85% de Fase A nos 15 primeiros min, 85 a 50% nos próximos 10 min e 50 até 30% nos próximos 9 min e 30 a 0% nos 11 min finais.

Amostras de 100,00 mL de vinho foram extraídas com 4 porções de 10,0 mL de acetato de etila. As fases orgânicas foram reunidas, levadas até secura e dissolvidas em 10,00 mL de solução aquosa de etanol (10% v/v). Após filtração em membrana de nitrato de celulose (Millipore®, 0,45 µm), as amostras foram analisadas por cromatografia.

A determinação de resveratrol foi viabilizada por padronização externa, utilizando-se uma curva analítica elaborada com padrão de resveratrol (Sigma), na faixa de concentração compreendida entre 0,5 e 7,0 mg L⁻¹ (n=8).

Determinação de fenóis totais

A determinação de formas fenólicas totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu,^{2,5,9} que se fundamenta na redução dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstúico na presença de formas fenólicas, com formação de complexos de coloração azul que absorvem fortemente entre 620 e 700 nm.

Porções de 1,00 mL da amostra de vinho foram transferidas para um balão volumétrico de 100,00 mL, completando-se o volume com água destilada. Uma alíquota de 1,00 mL desta solução foi adicionada de 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (2,0 mol L⁻¹) e 2,5 mL de água destilada e agitada vigorosamente. Após 10 min foi adicionado 1,0 mL de Na₂CO₃ (20% m/v), agitando-se por 30 s. A mistura foi mantida em local escuro durante 2 h, registrando-se a absorvância em 760 nm.

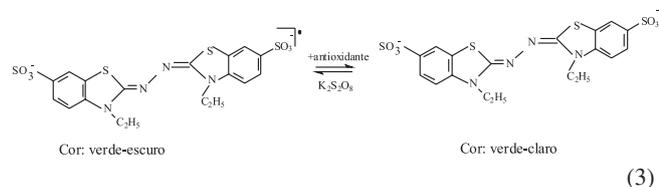
Curvas analíticas foram elaboradas entre 0,25 e 2,5 g L⁻¹, utilizando-se solução padrão de ácido gálico. Devido à heterogeneidade estrutural dos compostos fenólicos, os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico.

Determinação da atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante foi realizada por espectroscopia na região do visível, utilizando-se método fundamentado na inativação do radical $ABTS^{\cdot+}$ (Equação 3).¹² O referido radical foi formado através da reação entre 5,0 mL da solução estoque de ABTS ($7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, Acros) e 88 μL de solução de persulfato de potássio ($0,14 \text{ mol L}^{-1}$). A mistura foi mantida no escuro durante 18 h, sendo posteriormente diluída em álcool etílico até absorvância de $0,80 \pm 0,05$ em 734 nm (diluição típica de 1,0 mL em 100 mL).

Para traçar a curva analítica utilizou-se solução etanólica de Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico, Sigma), um antioxidante análogo à vitamina E, na faixa de concentração compreendida entre $1,0 \times 10^{-4}$ e $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($n=5$). Em ambiente escuro, 30 μL da solução de Trolox foram adicionadas a 3,0 mL da solução de radical $ABTS^{\cdot+}$, agitando-se durante 20 s. Após 6 min, a leitura foi realizada em 734 nm.

Na análise das amostras de vinho foi utilizado um procedimento idêntico, utilizando-se amostras diluídas 5 vezes ($2,00 \rightarrow 10,00 \text{ mL}$).



Estudos quimiométricos

Estudos quimiométricos foram realizados por rotinas de análise de componentes principais (PCA) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), ambas executadas em ambiente Matlab (versão 6.5) com funções PLS-toolbox.

Para construção dos modelos de calibração multivariada foram utilizados os dados espectrais obtidos na região do visível (400-800 nm), os quais foram correlacionados com a concentração de resveratrol, polifenóis totais e atividade antioxidante, parâmetros estes obtidos pelos métodos de referência. Diversos sistemas de pré-processamento de sinais foram avaliados, dentre os quais se destacam dados centrados na média, alisados e derivados.

O conjunto total de espectros (47 amostras) foi dividido em dois subconjuntos: um de calibração ($n=42$) e outro de validação externa ($n=5$), este último composto pelas amostras A3, A16, A29, A37 e A44. O número de variáveis latentes foi selecionado a partir da análise dos valores de erro de previsão na etapa de validação cruzada (RMSEV: *root mean square error of cross validation*, Equação 4), realizada por uma rotina de *leave-one-out*. A capacidade de previsão dos modelos foi avaliada em função dos erros de previsão (RMSEP) associados ao conjunto de validação externa.

$$\text{RMSEV (ou RMSEP)} = [\sum (y_{\text{previsto}} - y_{\text{referência}})^2 / n]^{1/2} \quad (4)$$

onde: n é o número de amostras, $y_{\text{referência}}$ são os valores determinados pelo método de referência e y_{previsto} são os valores previstos pelo modelo PLS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Intensidade de cor (IC) e tonalidade (T)

O vinho corresponde a uma complexa mistura de substâncias, o que faz com que seja bastante difícil estabelecer correlações entre a sua cor e composição química.¹³ Mesmo assim, estima-se que a

intensidade e a tonalidade da cor estejam estreitamente relacionadas à presença de pigmentos hidrossolúveis de natureza fenólica, principalmente antocianinas, e à formação de produtos de condensação durante o seu envelhecimento.¹⁴ Desta forma, a coloração do vinho tinto pode mudar de vermelho-azulada (vinhos jovens) à marrom-avermelhada (vinhos maduros), basicamente em função da formação de pigmentos poliméricos, por reação entre antocianinas e outras formas fenólicas.¹⁵

De maneira geral, estima-se que as reações que caracterizam o envelhecimento do vinho podem ser evidenciadas por modificações no espectro de absorção na região do visível, particularmente nos comprimentos de onda considerados no cálculo do índice de cor (420, 520 e 620 nm). Nos espectros apresentados na Figura 1 é possível verificar perfis de absorção similares para grande parte das amostras. Outras, entretanto, apresentam elevada absorção na região monitorada (10, 11 e 39), ao mesmo tempo em que apresentam elevados valores de IC (Figura 2). Um comportamento diferenciado também pode ser observado nas amostras 6, 16, 17 e 18, as quais apresentam baixa intensidade de absorção e, conseqüentemente, baixos valores de IC.

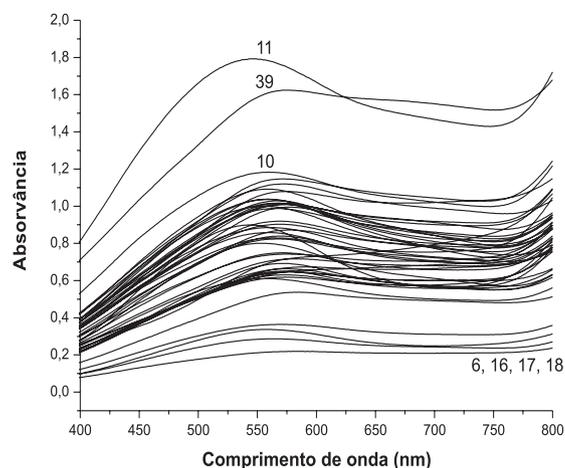


Figura 1. Espectros eletrônicos (400-800 nm) das amostras de vinho utilizadas no estudo

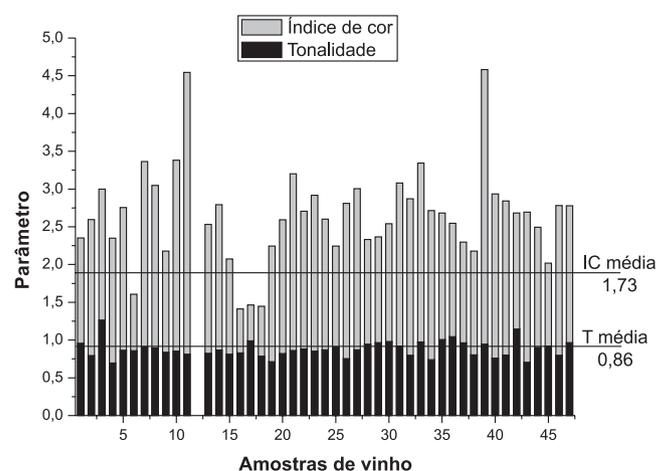


Figura 2. Representação gráfica dos valores índice de cor (IC: $Ab. 420 \text{ nm} + Ab. 520 \text{ nm} + Ab. 620 \text{ nm}$) e de tonalidade (T: $Ab. 420 \text{ nm}/Ab. 520 \text{ nm}$) nas amostras de vinho analisadas

Em teoria, os valores de IC deveriam servir de subsídio para a caracterização ou classificação de amostras de vinho, principalmente em relação ao grau de envelhecimento. Entretanto, esta avaliação não pode ser convenientemente realizada levando-se em consideração

apenas os valores de absorção em comprimentos de onda característicos, em função da interferência provocada pelas inúmeras espécies químicas presentes no vinho. As amostras 10 e 11, por exemplo, mesmo apresentando os maiores valores de IC, pertencem à mesma safra que as amostras 6, 16, 17 e 18, que apresentam os mais baixos valores deste parâmetro.

Objetivando verificar a existência de semelhanças e diferenças espectrais que pudessem ser correlacionadas com a safra ou com o grau de maturidade dos vinhos, os dados espectrais foram processados por uma rotina de PCA. O processamento dos dados espectrais (400-800 nm) centrados na média permitiu verificar que duas componentes principais (CPs) são capazes de representar aproximadamente 94% da variância dos dados espectrais. No gráfico de escores (Figura 3) é possível observar certa distinção entre as amostras de vinhos mais “velhos” (safra de 2000, 2004, 2005 e 2006) e mais “novos” (safra de 2007 e 2008), diferenciação esta que é viabilizada pela segunda componente principal. Uma vez que o gráfico de pesos (*loadings*) para a segunda CP (Figura 1S, material suplementar) mostra grande relevância da região espectral centrada em 550 nm, é possível assumir que a diferenciação observada é uma função da presença de produtos de condensação entre antocianinas e catequinas.¹⁶

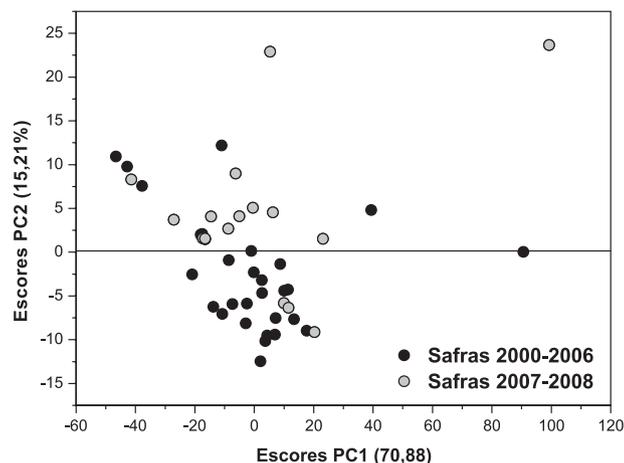


Figura 3. Gráfico de escores para as duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) na análise de dados espectrais por rotina de PCA

Utilizando-se outras componentes principais é possível observar alguns agrupamentos envolvendo vinhos do mesmo varietal (Figura 2S, material suplementar). Neste caso, o critério não corresponde apenas aos comprimentos de onda usualmente utilizados para avaliar índice de cor e tonalidade (420, 520 e 620 nm), mas praticamente toda a região espectral monitorada (Figura 1S, material suplementar). Novamente, a existência de amostras de um mesmo varietal classificadas em regiões diferentes indica que a informação espectral monitorada não reúne todos os argumentos necessários para uma adequada diferenciação dos vinhos, levando-se em consideração o grau de envelhecimento.

Concentração de polifenóis totais

Inicialmente, a repetibilidade da metodologia foi avaliada por análise em quintuplicata de uma mesma amostra de vinho e por análise em triplicata de 7 amostras diferentes. Em todos os casos foi observado um desvio padrão relativo médio inferior a 3%, o que demonstra uma boa precisão da metodologia utilizada.

A concentração de polifenóis totais nas 47 amostras analisadas é apresentada na Figura 4. Os valores limites foram 0,97 (amostra 45) e 2,91 (amostra 11), com valor médio de 1,91 g L⁻¹. Embora a

concentração de compostos fenólicos varie consideravelmente, em função da variedade da uva, dos fatores ambientais no vinhedo, das técnicas de processamento e das condições de armazenamento (maturação),⁹ os referidos resultados mostram-se coerentes com os resultados relatados na literatura para vinhos similares.^{2,17}

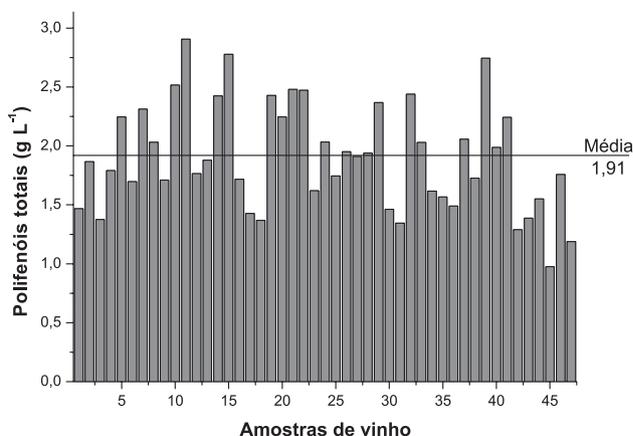


Figura 4. Representação gráfica da concentração de polifenóis totais nas amostras de vinho analisadas

As amostras 11 e 39 apresentam as maiores concentrações de fenóis totais (Figura 4), ao mesmo tempo em que mostram elevada intensidade de absorção (Figura 1) e elevados valores de índice de cor (Figura 2). Por sua vez, as amostras 16, 17 e 18 apresentam as menores concentrações de fenóis totais, assim como baixos valores de absorção e intensidade de cor. Estas observações sugerem, pelo menos em primeira análise, que os dados espectrais podem fornecer informação relevante para a elaboração de modelos que objetivem a quantificação de formas fenólicas.

Neste trabalho, modelos multivariados de calibração foram elaborados a partir de dados espectroscópicos (400-800 nm), utilizando-se regressão por mínimos quadrados parciais e diversos sistemas de pré-processamento de sinais. Os modelos foram desenvolvidos a partir de um conjunto de calibração composto por 42 amostras, sendo que as 5 amostras restantes (A3, A16, A29, A37 e A44) foram reservadas para validação externa do modelo.

Utilizando-se 4 variáveis latentes, que representam 44,21% da variância da matriz de concentração e 99,83% da variância da matriz de espectros, os modelos permitiram a obtenção de erros de previsão (validação externa) da ordem de 15%, com pouca influência dos sistemas de pré-processamento utilizados (Tabela 2). A presença de amostras anômalas foi verificada pela avaliação dos parâmetros resíduos de Student e *Leverage* (resultados não apresentados). Nesta avaliação, a amostra 15 apresentou um valor de resíduo superior ao limite (2,5), enquanto que as amostras 4 e 11 apresentaram elevados valores de *Leverage* (maior que 0,29). Em função deste fato, novos modelos foram desenvolvidos na ausência destas amostras, com resultados praticamente idênticos aos relatados anteriormente.

Explicar a falta de ajuste representa uma tarefa difícil, principalmente levando-se em consideração a extrema complexidade química das amostras de vinho. De qualquer forma, estima-se que grande parte da discrepância seja devida à pouca seletividade da metodologia de Folin-Ciocalteu, a qual está sujeita à interferência por parte de espécies redutoras de caráter não fenólico. Este tipo de limitação foi muito bem destacada em recente publicação,¹⁸ na qual se salienta a baixa seletividade da técnica e a significativa interferência por parte de substâncias naturalmente presentes em produtos vegetais, como vitamina C, bissulfito e xantinas.

Tabela 2. Previsão do teor de fenóis totais do conjunto de validação externa utilizando-se modelos desenvolvidos com 4 variáveis latentes e espectros centrados na média (CM), em primeira derivada (1ª deriv.) e em segunda derivada (2ª deriv.)

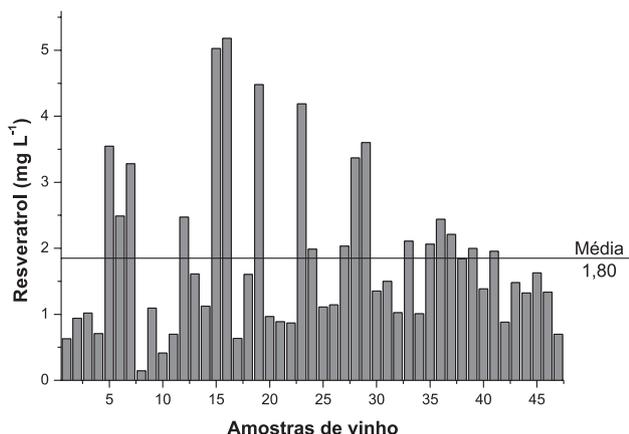
Amostra	Fenóis totais (g L ⁻¹)	Valor previsto (g L ⁻¹)					
		CM	Erro (%)	1ª deriv.	Erro (%)	2ª deriv.	Erro (%)
A3	1,38	1,18	-14,49	1,31	-5,07	1,41	2,17
A16	1,72	1,43	-16,86	1,44	-16,27	1,34	-22,09
A29	2,37	1,60	-32,48	1,63	-31,22	1,61	-32,06
A37	2,06	1,78	-13,59	1,65	-19,90	1,71	-16,99
A44	1,55	1,65	6,45	1,63	5,16	1,61	3,87
Erro Médio(%)*			16,77		15,52		15,43

$$* \text{Erro}(E) = \frac{x_i - x}{x} * 100, \quad \bar{E} = \frac{\sum |E|}{n}$$

Concentração de resveratrol

Inicialmente, a precisão (repetibilidade) da metodologia foi avaliada por análise em triplicata de 3 amostras de vinho. Os valores médios encontrados nesta avaliação foram de 0,68 a 1,33 mg L⁻¹, com desvios médios da ordem de 6%. Desvios desta magnitude são superiores aos apresentados por metodologias cromatográficas fundamentadas em injeção direta das amostras.¹⁹ Entretanto, mostram-se inferiores aos valores apresentados por metodologias precedidas por procedimentos de extração em fase sólida.²⁰

Os resultados encontrados na análise das 47 amostras de trabalho são apresentados na Figura 5. Embora o intervalo de concentração encontrada esteja entre 0,14 e 5,75 mg L⁻¹, com valor médio da ordem de 1,8 mg L⁻¹, grande parte das amostras apresentam concentração entre aproximadamente 1,0 e 2,0 mg L⁻¹, valores que se mostram coerentes com os resultados reportados por Souto *et al.*, na análise de vinhos tintos nacionais.⁸

**Figura 5.** Representação gráfica da concentração de resveratrol nas amostras de vinho analisadas

As diferenças observadas entre vinhos de diferentes procedências podem ser devidas a um conjunto de características conhecido como *terroir*, que reúne aspectos relacionados com o solo e o clima, dentre outras características locais. As amostras de vinho doadas pela vinícola Miolo, por exemplo, são oriundas de três regiões distintas do Estado do Rio Grande do Sul (Campanha Gaúcha - amostra 11, Campos de Cima - amostra 10 e Vale dos Vinhedos - amostra 15). Embora todas as amostras sejam da mesma varietal (Merlot), maiores quantidades de resveratrol foram observadas nas amostras procedentes do Vale dos Vinhedos. De acordo com informações climáticas do Estado do Rio Grande do Sul,²¹

a precipitação anual média é semelhante nestas 3 regiões. Na região do Vale dos Vinhedos, entretanto, a temperatura média é superior à das outras regiões, o que, sugerindo um maior grau de insolação, pode justificar a geração de maiores concentrações de resveratrol.

Adicionalmente, é importante considerar que, de acordo com a legislação brasileira (Lei Nº 7.678 de novembro de 1988), um vinho pode ter a denominação de determinada uva se contiver, no mínimo, 75% dessa variedade. Esta exigência implica que outras variedades de uva podem ser misturas, em proporção de até 25%, o que representa mais uma fonte de variação que dificulta a caracterização de vinhos, mesmo utilizando-se amostras do mesmo varietal.

Nenhuma correlação evidente foi observada entre o teor de polifenóis totais (Figura 4) e o teor de resveratrol (Figura 5). Assim, a amostra 8, que apresenta a menor concentração de resveratrol, e a amostra 16, que apresenta o maior valor, apresentam valores intermediários de polifenóis totais.

Atividade antioxidante

Preliminarmente, a repetibilidade da metodologia foi avaliada por análise em duplicata de 8 amostras de vinho, observando-se um desvio padrão relativo médio (3,65%) compatível com os valores relatados na literatura para este tipo de ensaio.⁹

Os resultados da avaliação de atividade antioxidante, expressa em mmol L⁻¹ de Trolox por mL de vinho, são apresentados na Figura 6. Os valores mínimo e máximo deste parâmetro corresponderam a 0,83 e 2,79, respectivamente, enquanto que o valor médio foi de 2,03 mmol L⁻¹ de Trolox por mL de vinho. Estes resultados são compatíveis com os resultados publicados na literatura, os quais indicam um intervalo entre 0,91 e 3,05.⁹

Vários estudos têm demonstrado a existência de uma boa correlação ($R = 0,99$) entre a atividade antioxidante e a concentração de polifenóis totais.²² Fazendo-se a correlação com os dados obtidos neste trabalho foi observada uma tendência geral que confirma a conexão existente entre estes parâmetros. Entretanto, existem vários casos em que a correlação é baixa, o que faz com que os coeficientes de correlação sejam muito inferiores aos relatados na literatura. Relacionando-se todas as amostras (diversas nacionalidades e espécies de uva) obtém-se um coeficiente de correlação (R) de 0,15, enquanto que se comparando apenas uma espécie de uva, mas com diferentes safras e nacionalidades, se consegue um valor de R de 0,38. No melhor dos casos, envolvendo amostras produzidas na mesma safra e com o mesmo tipo de uva, observam-se valores de R de 0,63, ainda bastante baixos em relação aos antecedentes da literatura.

Para ilustrar esta falta de correlação podem-se salientiar os resultados apresentados pela amostra 19, que apresenta uma capacidade

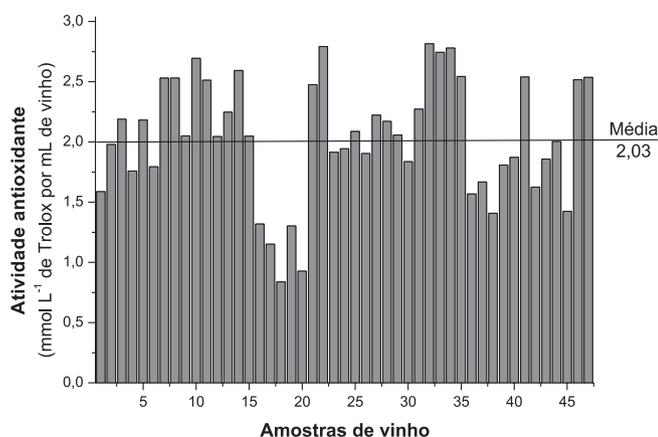


Figura 6. Representação gráfica da atividade antioxidante (equivalentes em Trolox) nas amostras de vinho analisadas

antioxidante das mais baixas e concentração de fenóis totais acima da média. Por sua vez, a amostra 34 apresenta um dos mais elevados valores de atividade antioxidante, ao mesmo tempo em que mostra um teor de espécies fenólicas bem abaixo da média.

Observações similares podem ser realizadas em relação à correlação existente entre a capacidade antioxidante e o teor de resveratrol. Neste caso, a baixa concentração relativa de resveratrol justifica a sua pouca influência na capacidade antioxidante das amostras de vinho.

De maneira geral, admite-se que grande parte da atividade antioxidante das amostras de vinho seja função das espécies polifenólicas características. Desta forma, a falta de correlação entre estes parâmetros pode ser função da falta de seletividade da técnica utilizada para a determinação de polifenóis totais (método de Folin-Ciocalteu).

Em função da correlação existente entre a capacidade antioxidante do vinho, o teor de espécies polifenólicas e o sinal espectral registrado entre 400 e 800 nm, modelos multivariados foram desenvolvidos por regressão por mínimos quadrados parciais. Os referidos modelos foram desenvolvidos a partir da informação espectral de 42 amostras de vinho, enquanto que outras 5 foram reservadas para validação externa. Diversos sistemas de pré-processamento de sinais foram avaliados, destacando-se dados centrados na média, alisados e derivados.

O modelo de melhor desempenho foi elaborado com dados espectrais centrados na média e 4 variáveis latentes, as quais permitiram representar aproximadamente 60% da variância dos dados de atividade antioxidante, a partir de 97% da variância dos dados espectrais. Nestas condições, erros médios de previsão da ordem de 3% foram observados na fase de validação externa (Tabela 3), valores estes que se mostram compatíveis com o valor de desvio médio observado na aplicação do método de referência (3,65%).

Tabela 3. Previsão da atividade antioxidante do conjunto de validação externa utilizando-se modelos desenvolvidos a partir de 4 variáveis latentes e espectros centrados na média (CM) e em primeira derivada (1ª deriv.)

Amostra	Atividade antioxidante (mM TEAC)	Valor previsto (mmol L ⁻¹ de Trolox por mL de vinho)			
		CM	Erro (%)	1ª deriv.	Erro (%)
A3	2,18	2,14	-1,83	2,18	0
A16	1,32	1,31	-0,75	1,25	-5,30
A29	2,26	2,11	-6,63	2,11	-6,63
A37	1,61	1,63	1,24	1,61	0
A44	1,70	1,67	-1,76	1,63	-4,11
Média			2,44		3,21

Na Figura 3S, material suplementar, se apresenta o vetor de regressão obtido na modelagem de dados centrados na média com 4 variáveis latentes. Nessa figura, que representa as regiões espectrais de relevância para estabelecimento da modelagem, é possível observar regiões de regressão positiva (centradas em aproximadamente 425, 495 e 590 nm) e negativa (535 nm), cada uma das quais pode ser correlacionada com espécies polifenólicas de relevância, dentre as quais se destacam antocianinas, taninos e uma grande variedade de produtos de condensação entre antocianinas e flavonoides.¹⁶

Embora a capacidade de previsão do modelo se mostre adequada em relação ao conjunto de validação externa ($R^2 = 0,977$), foi observada uma baixa correlação entre valores medidos pelo método de referência e valores previstos pelo modelo para o conjunto de calibração na fase de validação cruzada ($R^2 = 0,64$, Figura 4S, material suplementar). A referida inconsistência implica que, para algumas amostras de vinho, as regiões espectrais processadas sofrem influência de espécies químicas que não contribuem com a capacidade antioxidante avaliada (interferência) ou espécies que efetivamente contribuem com a expressão de atividade antioxidante não possuem sinal espectral na região processada.

CONCLUSÕES

Praticamente todos os parâmetros físico-químicos relacionados com a atividade antioxidante de vinhos foram avaliados (cor, teor de polifenóis totais, concentração de resveratrol e atividade antioxidante), encontrando-se resultados que se mostram compatíveis com os antecedentes relatados na literatura para amostras de natureza similar.

Estudos quimiométricos fundamentados no uso de análise de componentes principais permitiram verificar certa correlação entre o grau de maturação dos vinhos e os dados espectrais registrados entre 400 e 800 nm. Outras correlações são menos evidentes (ex. cor e maturação, cor e teor de polifenóis totais, polifenóis totais e atividade antioxidante), em razão da complexidade química das amostras de vinho e da pouca seletividade das ferramentas analíticas de caracterização (ex. método de Folin-Ciocalteu).

O uso de dados espectrais permitiu a elaboração de modelos multivariados com boa capacidade de previsão da atividade antioxidante. Modelos fundamentados no uso de dados espectrais centrados na média e elaborados a partir de 4 variáveis latentes permitiram a obtenção de erros de previsão médios da ordem de 3%, na fase de validação externa.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Disponível em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

Na Figura 1S apresenta-se o gráfico de pesos (*loadings*) para as 5 primeiras componentes principais na análise de dados espectrais por rotina de PCA. Na Figura 2S apresenta-se o gráfico de *scores* para as componentes principais 2 e 3 na análise de dados espectrais por rotina de PCA. Na Figura 3S apresentam-se os coeficientes de regressão obtidos na modelagem da atividade antioxidante com dados espectrais centrados na média e 4 variáveis latentes. Na Figura 4S apresenta-se o gráfico de atividade antioxidante medida e prevista pelo modelo multivariado para o conjunto de calibração na fase de validação cruzada.

REFERÊNCIAS

- Renaud, S.; Lorgetil, M.; *Lancet* **1992**, 339, 1523.
- Minussi, R. C.; Rossi, M.; Bologna, L.; Cordi, L.; Rotilio, D.; Pastore, G. M.; Duran, N.; *Food Chem.* **2003**, 82, 409.

3. Nepomuceno, M. F.; Mamede, M. E. O.; Macedo, D. V.; Armindo, A. A.; Pereira, L. S.; Tabak, M.; *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1418*, 285.
4. Halliwell, B.; *Free Radical Biol. Med.* **2009**, *46*, 531.
5. Katalinić, V.; Milos, M.; Modun, D.; Musić, I.; Boban, M.; *Food Chem.* **2004**, *86*, 593.
6. Villaño, D.; Fernández-Pachón, M. S.; Troncoso, A. M.; García-Parrilla, M. C.; *Food Chem.* **2006**, *95*, 394.
7. Gürbüz, O.; Göçmen, D.; Delen, F. D.; Gürsoy, M.; Aydın, S.; Sahin, I.; Büyükuysal, L.; Usta, M.; *Food Chem.* **2007**, *100*, 518.
8. Souto, A. A.; Carneiro, M. C.; Seferin, M.; Senna, M. J. H.; Conz, A.; Gobbi, K.; *J. Food Comp. Anal.* **2001**, *14*, 441.
9. Li, H.; Wang, X.; Li, Y.; Li, P.; Wang, H.; *Food Chem.* **2009**, *112*, 454.
10. Staško, A.; Brezová, V.; Mazúr, M.; Čertík, M.; Kaliňák, M.; Gescheidt, G.; *Food Sci. Technol.* **2008**, *41*, 2126.
11. Castillo-Sánchez, J. J.; Mejuto, J. C.; Garrido, J.; García-Falcón, S.; *Food Chem.* **2006**, *97*, 130.
12. Kuskoski, E. M.; Asuero, A. G.; Troncoso, A. M.; Mancini-Filho, J.; Fett, R.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2005**, *25*, 726.
13. Versari, A.; Boulton, R. B.; Parpinello, G. P.; *Food Chem.* **2008**, *106*, 397.
14. Castillo-Sánchez, J. X.; García-Falcón, M. S.; Garrido, J.; Martínez-Carballo, E.; Martins-Dias, L. R.; Mejuto, X. C.; *Food Chem.* **2008**, *106*, 18.
15. Monagas, M.; Martín-Álvarez, P. J.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B.; *Food Sci. Technol.* **2007**, *40*, 107.
16. Vivar-Quintana, A. M.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J. C.; *Anal. Chim. Acta* **2002**, *458*, 147.
17. Pazourek, J.; Gajdošová, D.; Spanilá, M.; Farková, M.; Novotná, K.; Havel, J.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1081*, 48.
18. de Oliveira, A. C.; Valentin, I. B.; Goulart, M. O. F.; Silva, C. A.; Bechara, E. J. H.; Trevisan, M. T. S.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 689.
19. Zhou, J.; Cui, H.; Wan, G.; Xu, H.; Pang, Y.; Duan, C.; *Food Chem.* **2004**, *88*, 613.
20. Rodríguez-Delgado, M. A.; González, G.; Pérez-Trujillo, J. P.; García-Montelongo, F. J.; *Food Chem.* **2002**, *76*, 371.
21. [http://www.scp.rs.gov.br/atlas/atlas.asp? menu=26](http://www.scp.rs.gov.br/atlas/atlas.asp?menu=26), acessada em Setembro 2009.
22. Villaño, D.; Fernández-Pachón, M. S.; Troncoso, A. M.; García-Parrilla, M. C.; *Talanta* **2004**, *64*, 501.

CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA MULTIVARIADA DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE VINHOS

Wellington César Gallice, Iara Messerschmidt e Patricio Peralta-Zamora*

Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, CP 19081, 81531-980 Curitiba - PR, Brasil

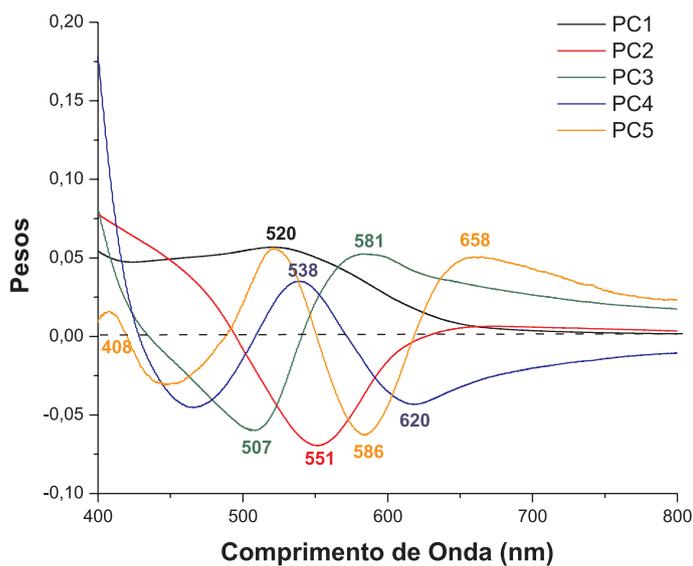


Figura 1S. Gráfico de pesos (loadings) para as cinco primeiras componentes principais na análise de dados espectrais por rotina de PCA

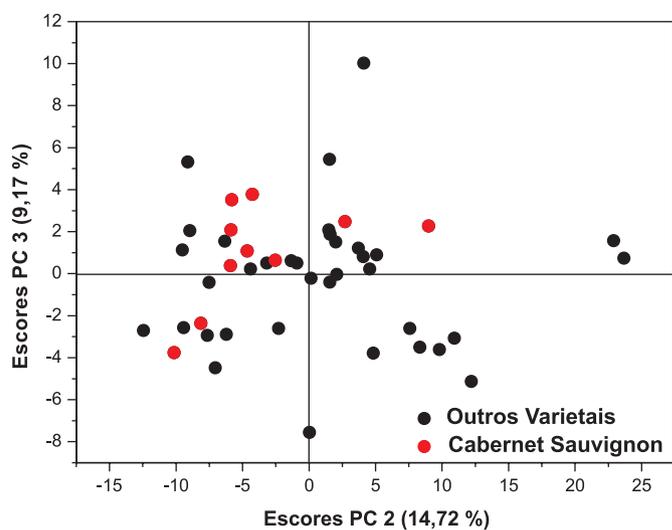


Figura 2S. Gráfico de escores para as componentes principais 2 e 3 na análise de dados espectrais por rotina de PCA

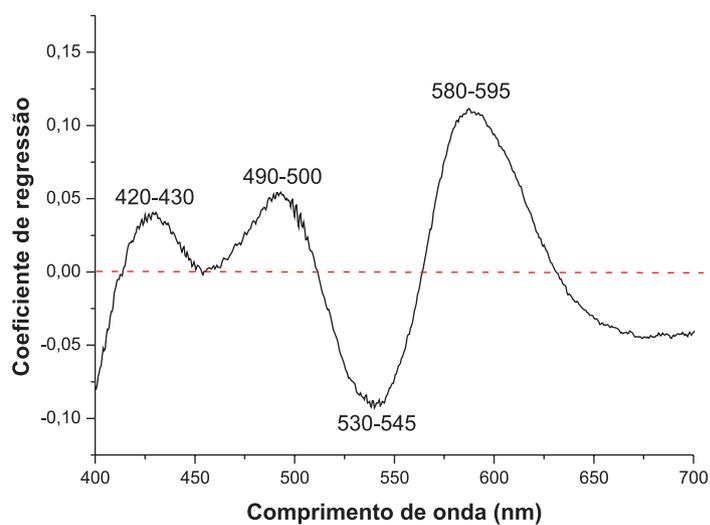


Figura 3S. Coeficientes de regressão obtidos na modelagem da atividade antioxidante com dados espectrais centrados na média e 4 variáveis latentes

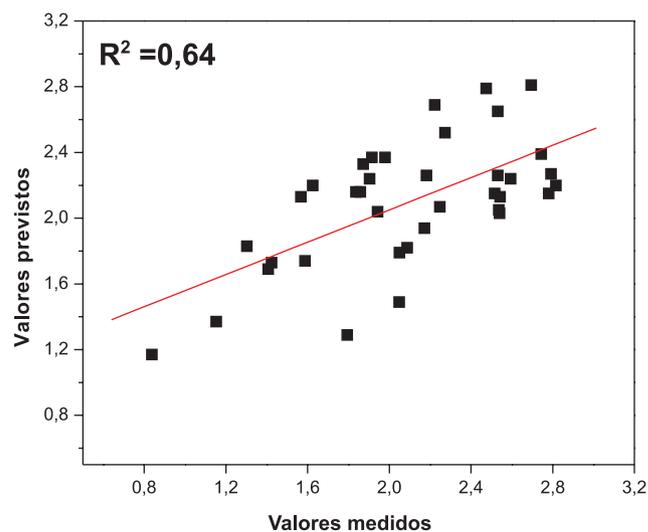


Figura 4S. Gráfico de atividade antioxidante medida e prevista pelo modelo multivariado para o conjunto de calibração na fase de validação cruzada