

**Determinação de Antioxidantes
por Cromatografia Líquida de Alta
Pressão com Detecção
Electroquímica**

Sara Margarida da Costa Gomes

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química, ramo de
Controlo de Qualidade e Ambiente

Julho de 2010

Professora Doutora Ana Maria Brett

Universidade de Coimbra

“Os dias prósperos não vêm ao acaso; são granjeados, como as searas, com muita fadiga e com muitos intervalos de desalento.”

(Camilo Castelo Branco)

ÍNDICE

Índice.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Agradecimentos.....	vii
Capítulo 1.....	1
Introdução.....	1
1.1 Compostos fenólicos.....	2
1.2 Flavonóides.....	4
1.3 Antocianinas.....	11
1.4 Cromatografia Líquida de alta pressão com detecção electroquímica.....	14
Determinação de flavonóides por HPLC.....	19
1.5 Aplicação.....	20
Capítulo 2.....	21
Experimental.....	21
2.1 Introdução.....	22
2.2 Reagentes e materiais.....	22
Soluções e fases móveis utilizadas.....	23
Equipamentos e instrumentação.....	23
Condições cromatográficas.....	24
Capítulo 3.....	26
Determinação de antioxidantes fenólicos por HPLC-ED.....	26
3.1 Introdução.....	27
3.2 Optimização das condições de separação cromatográfica.....	29

3.3. Determinação de flavonóides padrão por HPLC-ED	29
3.4. Estudo dos antioxidantes presentes na película das uvas pretas	33
3.4.1 Método de extracção dos antioxidantes presentes na película das uvas pretas.....	34
3.4.2 Aplicação do método HPLC-ED à determinação de antioxidantes em películas de uvas pretas.....	36
Capítulo 4	43
Conclusões Gerais.....	43
Capítulo 5	45
Bibliografia.....	45

RESUMO

O objectivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento dum método para determinação de antioxidantes fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Detecção Electroquímica (HPLC-ED).

Para o cumprimento deste objectivo tornou-se necessário desenvolver e optimizar um método de extracção de antioxidantes fenólicos de uvas pretas para posterior determinação por HPLC-ED.

De forma a poder determinar os limites de quantificação e de detecção, procedeu-se a um método analítico desenvolvido para determinação de alguns flavonóides, presentes nas uvas em estudo, por HPLC com detecção electroquímica. Os limites de detecção obtidos para os vários flavonóides foram inferiores a 20 nM.

ABSTRACT

The aim of this work was to develop a method for determination of phenolic antioxidants by High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection (HPLC-ED).

For this propose was necessary developed and opitimized a method of extraction of phenolic antioxidants of red grapes and later was made the determination of phenolic antioxidants by HPLC-ED.

To be able to determine the limits of quantification and detection, we proceeded to an analytical method for determination of some flavonoids in grapes studied by HPLC with electrochemical detection. The detection limits obtained for these flavonoids were lower than 20 nM.

AGRADECIMENTOS

Desde já queria começar por agradecer à Professora Doutora Ana Maria Oliveira Brett, por todos os ensinamentos e paciência ao longo destes dois anos de trabalho.

Um agradecimento muito especial ao Victor Diculescu, que esteve sempre disponível para me ajudar e ensinar. Quero agradecer também a todos os meus colegas do laboratório, pelos bons momentos que passamos juntos.

Quero agradecer também ao Eng. Ricardo Reis que me forneceu as uvas para poder desenvolver o meu trabalho.

A todos os meus amigos... pois foram eles que me confortaram em momentos de desalento, foi com eles que me diverti e são eles o meu porto de abrigo. Obrigado!!!

Como não poderia deixar de ser, quero agradecer aos meus pais, pois sem eles nunca teria chegado onde cheguei.

Agradeço também à minha família e a todas as pessoas que acreditaram sempre em mim e que me deram sempre muita força para que eu nunca desistisse de lutar pelos meus sonhos.

Obrigado a todos por fazerem parte da minha vida!

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos, constituem um dos maiores grupos de metabolitos secundários das plantas com mais de 8000 estruturas até agora conhecidas. Eles são importantes constituintes dos alimentos presentes na maioria dos produtos naturais, principalmente, em frutas e vegetais contribuindo para características como o sabor e a cor [1].

Ao longo dos tempos têm existido um crescente interesse nestes compostos devido ao seu efeito positivo contra algumas doenças, entre elas, o cancro e doenças coronárias, bem como pelos efeitos anti-bacterianos, anti-virais, anti-alérgicos e vasodilatadores [2-4]. Os compostos fenólicos são responsáveis pela remoção de radicais livres, neutralizando formas de oxigénio reactivo e pela inactivação de iões metálicos por quelatação.

Os principais compostos fenólicos identificados na dieta humana, classificados de acordo com o número de átomos de carbono do esqueleto base são: o grupo dos ácidos fenólicos, os flavonóides e os compostos poliméricos, lignina e taninos.

O nome “ácidos fenólicos”, em geral, descreve fenóis que possuem a funcionalidade dum ácido carboxílico. No entanto, quando são descritos metabolitos de plantas referem-se a diferentes grupos de ácidos orgânicos. Os ácidos fenólicos caracterizam-se pela presença de um único anel benzénico na sua molécula monomérica. Estão divididos em duas classes: uma com estrutura hidroxibenzóica, C₆-C₁, e outra com estrutura hidroxicinâmica, C₆-C₃, como é mostrado na figura 1.1. Em muitos casos, aldeídos análogos são também agrupados como ácidos fenólicos [5].

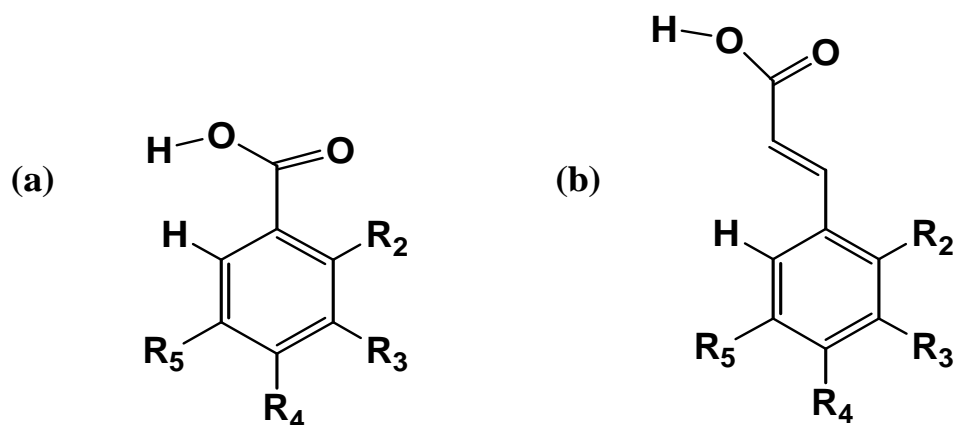


Figura 1.1– Esquema geral das duas classes de ácidos fenólicos: (a) estrutura hidroxibenzóica e (b) estrutura hidroxicinâmica.

Visto que, a estrutura benzénica base permanece sempre a mesma, o número e as posições dos grupos hidróxilos no anel aromático condicionam o aparecimento de ácidos fenólicos distintos e com diferentes propriedades químicas. Aqueles que possuem dois grupos hidróxilo na posição *orto*-, como por exemplo o ácido cafeíco, são facilmente oxidáveis a quinonas.

A estrutura química dos compostos fenólicos é especialmente, adequada para exercer uma acção antioxidante (como dador de H ou electrões, ou como receptor de radicais livres). Em estudos *in vitro*, muitos compostos fenólicos naturais são melhores antioxidantes que as vitaminas E ou C. A sua capacidade de quelatar metais, especialmente, cobre e ferro, faz com que actuem indirectamente como antioxidantes já que inibem a acção catalisadora dos metais na formação de radicais livres [8].

A remoção de radicais livres e o potencial antioxidante dos compostos fenólicos dependem do arranjo dos grupos funcionais da estrutura nuclear do composto. A estrutura base de todos os compostos fenólicos consiste na presença de um ou mais anéis benzeno hidroxilados. Quer o número, quer a configuração desses grupos hidroxilo, dadores de H são a base estrutural principal na capacidade antioxidante dos polifenóis [9,10]. No entanto são as ligações duplas conjugadas que permitem a deslocalização electrónica através da molécula, estabilizando o radical fenóxilo [11].

A actividade de um antioxidante é determinada por [1]:

- ✓ actividade como agente dador de H ou e^-
- ✓ local de interacção do radical antioxidante resultante que é controlado pela sua habilidade para estabilizar e deslocalizar o electrão desemparelhado
- ✓ reactividade com outros antioxidantes
- ✓ potencial de transição metal-quelato

Vários estudos têm sido realizados para estudar a actividade antioxidante dos compostos fenólicos [12-14].

Geralmente, a oxidação de compostos fenólicos produz radicais fenoxilo instáveis que podem ser oxidados a quinonas ou podem reagir entre eles para formar dímeros que depois polimerizam em compostos poliaromáticos [15].

Os vários estudos realizados a este propósito baseiam-se em técnicas electroquímicas [16]. A sua facilidade em oxidar-se será de grande importância para a sua eficiência como antioxidantes, daí o estudo electroquímico dos seus potenciais redox [16-19].

1.2 FLAVONÓIDES

Os flavonóides são compostos de baixo peso molecular derivados dos benzo- γ -piranos que contêm vários grupos hidróxilo unidos aos anéis de estrutura $C_6-C_3-C_6$, designados por A, B e C, figura 1.2. A sua actividade como antioxidante depende das propriedades redox dos seus grupos hidroxifenólicos e da relação estrutural entre as diferentes partes da estrutura química.

Os flavonóides são um grupo de compostos polifenólicos vastamente distribuído no reino vegetal. Existem mais de 4000 flavonóides quimicamente diferenciáveis, identificados em plantas. Estes compostos de baixo peso molecular são encontrados em frutas, vegetais, sementes, flores, assim como em vários sumos e bebidas naturais, sendo importantes constituintes da dieta humana [20,21].

Estrutura química e classificação

Os flavonóides têm uma estrutura geral que possui um esqueleto difenilpropano ($C_6C_3C_6$), isto é, dois anéis benzênicos (denominados anel A e anel B) unidos por um heterociclo que contém um átomo de oxigênio (anel C) figura 1.2.

A estrutura das várias classes de flavonóides mostra claramente que o anel A na maioria dos flavonóides é um grupo resorcinol, enquanto o anel B é um derivado do catecol.

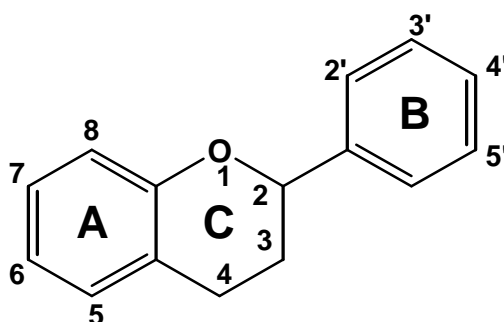


Figura 1.2 – Estrutura geral dos flavonóides.

Existem diferentes formas de classificar as subclasses de flavonóides. Uma delas, em função da configuração do anel C, divide os flavonóides em duas famílias, os que contêm um grupo hidróxilo na posição C3 do anel C são classificados como 3-hidroxi-flavonóides. A este grupo pertencem as subclasses de flavonóides: flavonol, flavanol e antocianinas. Aqueles que não possuem o grupo hidróxilo na posição C3 são conhecidos como 3-desoxiflavonóides, subgrupo a que pertencem as flavanonas e as flavonas [22]. Outra classificação foi feita em função da estrutura básica dos flavonóides sem ter em conta os grupos substituintes dos anéis obtendo-se assim: flavan-3-ol, flavanona, flavon-3-ol, antocianina, flavona e calcona [23].

Neste trabalho será utilizada uma outra classificação, por parecer mais completa e de fácil compreensão, baseada na ligação do anel B ao C assim como no estado de oxidação e nos grupos funcionais do anel C. Esta classificação faz a distinção entre flavonol, flavanol, flavanona, flavona, isoflavona e antocianina [24-26]. Um esquema elucidativo de todas as estruturas das diferentes subclasses de flavonóides está representado na figura 1.3.

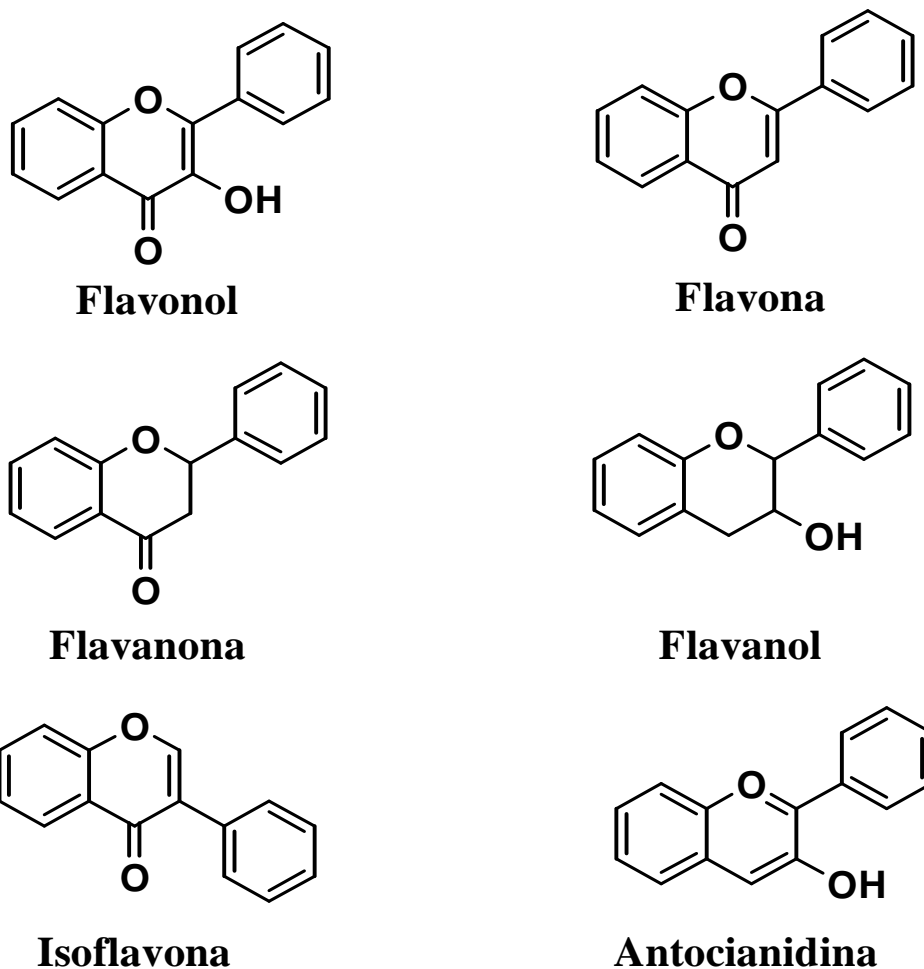


Figura 1.3– Estrutura geral das diferentes subclasses de flavonóides.

Flavonol: Os flavonóis apresentam uma estrutura planar com uma dupla ligação na posição C2-C3 do anel C o que confere insaturação ao anel. A ligação do anel B ao anel C ocorre através de C2 e apresenta um grupo cetônico na posição C4. O flavonol mais comum na dieta é a quercetina. Está presente em várias frutas e vegetais e a sua maior concentração foi encontrada na cebola. Um flavonol estudado neste trabalho foi a **quercetina**.

Flavanol: Os flavanóis apresentam um grupo hidróxilo no C3 e têm o anel B unido ao anel C através de C2. Não apresentam insaturação no anel C. O flavanol mais comum é a (+)-**catequina**, que foi também estudado neste trabalho. Também a (-)-epicatequina é encontrada habitualmente em frutas e vegetais. As mais altas concentrações de catequinas são encontradas no chá e no vinho tinto.

Dentro do grupo dos flavanóis existem as proantocianidinas, que são polímeros de catequinas. As proantocianidinas são compostos que libertam antocianidinas quando

aquecidas em meio fortemente ácido ou alcoólico, mediante a ruptura das ligações entre as unidades monoméricas. Consoante se liberte cianidina ou delphinidina, estas moléculas recebem o nome de procianidinas ou prodelfinidinas. As primeiras são polímeros de catequina e epicatequina e as segundas são constituídas por galocatequinas e epigalocatequinas.

Flavanona: Esta subclasse de flavonóides apresenta o anel B unido ao anel C através de C2, um grupo cetónico na posição do C4 e não apresenta insaturação no anel C. As flavanonas encontram-se exclusivamente em citrinos, estando em maior concentração nos tecidos sólidos, ainda que também sejam encontradas concentrações consideráveis nos sumos. A hesperetina e a naringenina são as flavanonas mais comuns.

Flavona: As características estruturais das flavonas são a dupla ligação entre os C2-C3 que lhes conferem insaturação no anel C, um grupo cetónico no C4, e a união do anel B ao anel C através do C2. As principais flavonas na dieta são apigenina e luteolina, sendo as suas fontes mais importantes a pimenta vermelha e o aipo.

Isoflavona: Este tipo de flavonóides tem o anel B ligado ao anel C através de C3, apresenta insaturação no anel C devido à dupla ligação entre os C2-C3 e também possui um grupo cetónico no C4. As isoflavonas mais abundantes são a genisteína e a daidzeína que ocorrem principalmente nos legumes.

Antocianidina: Apresentam o anel B ligado ao anel C através de C2, a insaturação do anel C deve-se a duas ligações duplas, C1-C2 e C3-C4, e um grupo hidróxilo no C3. Foram estudadas algumas antocianidinas bem como algumas *antocianinas* (antocianidinas glicosiladas). As mais comuns antocianidinas incluem a pelargonidina, cianidina, **delfinidina**, malvidina, **peonidina** e **petunidina**.

Os flavonóis e as flavonas possuem açúcares unidos preferencialmente no C3, ainda que também possam apresentar-se unidos ao C7 do anel A, pelo que estes compostos encontram-se comumente como O-glicósidos. A D-glucose é o açúcar mais frequentemente encontrado. Outros possíveis resíduos de açúcares são a D-galactose, a L-ramnose, a L-arabinose, a D-xilose, bem como o ácido D-glucorónico. A molécula sem açúcares ligados é conhecida como aglicona. Os compostos glicosilados são mais solúveis em água do que a sua respectiva aglicona [27].

Propriedades antioxidantes dos Flavonóides

Os flavonóides tal como a maioria dos compostos fenólicos exibem como actividades biológicas, acções anti-alérgicas [28], anti-virais [29], anti-inflamatórias [30] e vasodilatadoras [31].

O número de grupos hidróxilo, a natureza dos grupos substituintes e as suas posições específicas na estrutura dos anéis influenciam a função dos flavonóides como moduladores da actividade enzimática ou como antioxidantes *in vitro* e *in vivo* [3,31].

A importância dos antioxidantes para a saúde humana na protecção dos danos induzidos pelo stress oxidativo (que implica o risco de doenças crónicas) está hoje em dia a ser levada em conta nas recomendações alimentares, no desenvolvimento de alimentos funcionais e na extracção de novos compostos potencialmente terapêuticos a partir de plantas medicinais. Os frutos, os vegetais, os cereais e certas bebidas são ricos em flavonóides.

Na oxidação ocorre a transferência de electrões de um átomo para outro e representa uma parte essencial da vida aeróbia e do metabolismo animal. A respiração é um processo oxidativo importante na vida, onde a glucose e os ácidos gordos são transformados em energia. Esta transformação ocorre no interior da célula, onde é produzido ATP, que é a molécula chave para a síntese dos componentes celulares. Durante a respiração é consumido oxigénio e gerado ATP, ficando como resíduos dióxido de carbono e água. Mas neste processo também são geradas espécies reactivas de oxigénio, radicais livres conhecidos por ROS (*reactive oxygen species*), radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido (ROO^{\bullet}), alcóxido (RO^{\bullet}), hidróxido (HO^{\bullet}) e o óxido nítrico (NO^{\bullet}) [32].

Aproximadamente 1 a 3% do oxigénio que as células utilizam é transformado nestes radicais livres muito reactivos, que doutra forma seriam potencialmente letais, originando o denominado stress oxidativo, causador de doenças como: cancro, envelhecimento e cataratas [33]. As moléculas que protegem as células do stress oxidativo são denominadas genericamente de antioxidantes.

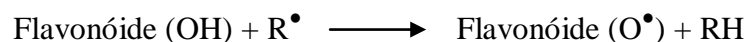
A actividade antioxidante dos flavonóides foi atribuída à sua habilidade para doar electrões.

Os flavonóides podem prevenir danos causados pelos radicais livres através de diferentes reacções [32,38,39]:

- ✓ Por inibição da acção das enzimas responsáveis da produção do anião superóxido, como a xantina oxidase e a proteína quinase C.
- ✓ Por quelação de metais vestigiais que têm um papel importante no metabolismo do oxigénio. O ião ferro e o cobre são possíveis potenciadores da formação de espécies reactivas de oxigénio, como por exemplo pela redução de peróxido de hidrogénio que dá origem a radicais hidróxido altamente agressivos:



- ✓ Por reacção directa com radicais livres. Os flavonóides são oxidados por radicais, resultando num radical mais estável e menos reactivo, *i.e.* os flavonóides estabilizam as espécies reactivas de oxigénio reagindo com o composto reactivo do radical:



Certos estudos demonstraram que as agliconas possuem maior poder antioxidante que os flavonóides conjugados [37].

Os grupos hidróxilo na estrutura dos anéis dos flavonóides, sobretudo o grupo catecol do anel B, que confere maior estabilidade à forma radical e participa na deslocalização dos electrões, são os responsáveis pelo carácter antioxidante que estes compostos apresentam [9,40]. Outros factos importantes nas características dos flavonóides são atribuídos à estrutura do anel C: a dupla ligação no C2-C3 em conjugação com a função cetona no C4, responsável pela deslocalização electrónica no anel B, e a presença adicional dos grupos hidróxilo nos C3 e C5 necessários para exercer o máximo poder antioxidante [33,41,42]. Segundo estes critérios, o flavonóide quercetina é o que melhor reúne os requisitos para exercer uma função antioxidante efectiva.

O comportamento electroquímico de flavonóides foi estudado por vários autores [45-50]. Os flavonóides podem ser electroquimicamente oxidados e a maioria mostra reacções de oxidação.

O mecanismo de acção predominante é provavelmente através da doação de um electrão ao radical, resultando por sua vez, na formação de uma semiquinona que pode ainda doar mais electrões até formar a quinona, figura 1.4. [9,51].

Tendo em conta a informação encontrada na literatura sobre a relação entre o potencial de oxidação e o poder antioxidante dos flavonóides, isto é, quanto mais baixo for o potencial de oxidação, maior é o seu poder antioxidante [50]. Verificou-se que os flavonóides exibem diferentes potenciais de oxidação e consequentemente diferente poder antioxidante, dependendo da subclasse a que pertencem e dos grupos substituintes que possuem.

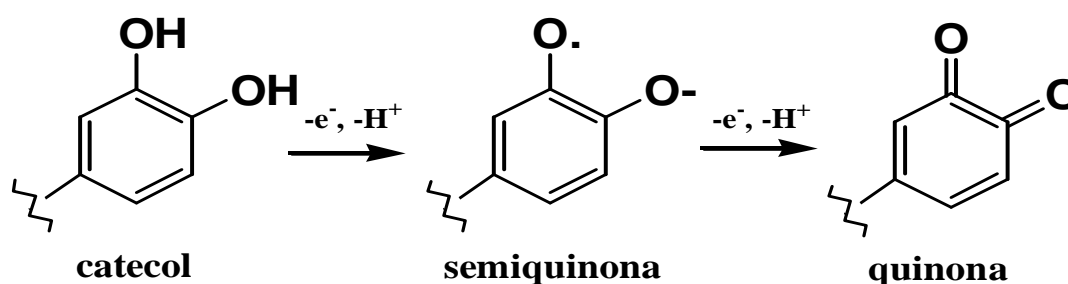


Figura 1.4 – Mecanismo de oxidação do anel B dos flavonóides.

Os métodos electroquímicos são muito importantes na caracterização destes antioxidantes. A capacidade dos antioxidantes para serem oxidados em eléctrodos inertes permite a sua monitorização usando técnicas electroquímicas, em conjunto com as técnicas de separação por cromatografia.

Dieta, metabolismo e absorção

Os flavonóides são pigmentos naturais presentes em vegetais que protegem o organismo do dano produzido por agentes oxidantes como os raios UV, a poluição ambiental, substâncias químicas presentes nos alimentos, etc. O organismo humano não pode produzir estas substâncias químicas protectoras, pelo que devem ser obtidas através da alimentação ou na forma de suplementos. Eles estão amplamente distribuídos em plantas, frutas, verduras e em diversas bebidas, componentes substanciais da parte não energética da dieta humana.

Os flavonóides não possuem as características das vitaminas: não são aminas e pertencem a outro grupo químico, mas pela sua acção protectora e a impossibilidade do

organismo humano em produzi-los merecem ser incorporados no grupo de nutrientes essenciais. Ainda que os hábitos alimentares sejam diversificados no mundo, o valor médio de ingestão de flavonóides foi estimado de ~20 mg/dia nos Estados Unidos, Finlândia e Dinamarca, e 70 mg/dia na Holanda, onde são predominantes os flavonóis, especialmente a quercetina [43].

As fontes alimentares principais dos flavonóides são, entre outras, o chá preto, a cebola, a maçã, a pimenta preta e as bebidas alcoólicas como o vinho e a cerveja.

O metabolismo dos flavonóides é complexo, sendo uma parte importante excretada pela urina. A metabolização dos flavonóides tem lugar em duas localizações, em primeiro lugar no fígado, através de reacções de biotransformação de fase I e em segundo lugar no cólon, através de reacções de biotransformação de fase II, nas quais os microorganismos degradam os flavonóides não absorvidos [44].

Existe uma grande controvérsia sobre se os flavonóides glicosilados são ou não absorvidos no corpo humano. A forma que é absorvida é a forma aglicona. Em geral, é considerado que os flavonóides glicosilados são absorvidos como agliconas depois de sofrer um processo prévio de hidrólise no interior do tracto digestivo.

De qualquer forma a indústria alimentar hoje em dia está a tentar aumentar o número de flavonóides agliconas em suplementos alimentares [39,44].

1.3 ANTOCIANINAS

As antocianinas são os pigmentos mais importantes das plantas visíveis pelo olho humano. Possuem efeitos terapêuticos positivos associados principalmente às suas propriedades antioxidantes, existindo vários estudos a este respeito [53-55]. A cianidinae os seus glicósidos representam um dos maiores grupos de antocianinas naturais com este tipo de propriedades [58].

As diferenças entre as antocianinas estão relacionadas com o número de grupos hidróxilo, natureza e número de açúcares unidos à molécula, a posição dessas ligações e a natureza e número de ácidos alifáticos ou aromáticos unidos aos açúcares da molécula.

Até à data existem 17 antocianidinas ou agliconas naturais conhecidas mas só 6 são comuns na maioria das plantas [53].

As seis antocianidinas mais comumente encontradas são: pelargonidina (Pg), peonidina (Pn), cianidina (Cy), malvidina (Mv), petunidina (Pt) e delphinidina (Dp).

Os glicósidos das três antocianidinas não metiladas (Cy, Dp e Pg) são as antocianinas mais encontradas na natureza, estando presentes em 80% dos pigmentos das folhas, 69% das frutas e 50% das flores [53].

Estruturalmente, as antocianinas são constituídas por dois anéis benzênicos unidos por um anel heterocíclico que pode ser do tipo pirano ou pirilo, figura 1.5. No grupo pirilo encontra-se o oxigênio tetravalente com uma valência livre, que confere carácter iónico à molécula inteira [59].

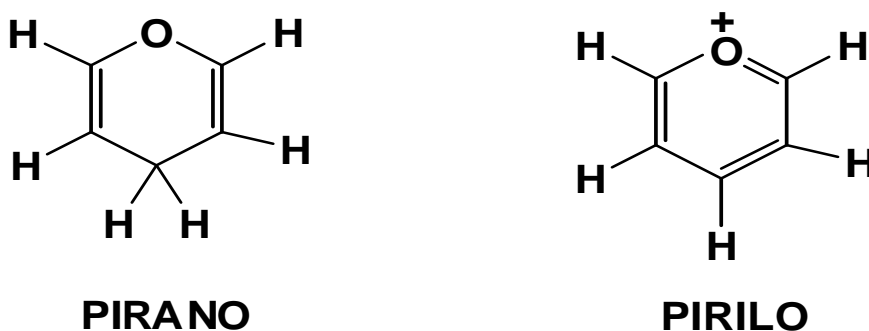


Figura 1.5 – Estruturas do grupo pirano e pirilo.

Estes compostos possuem muitos outros efeitos potencialmente benéficos para diversas doenças, como diabetes, deficiências de microcirculação que resultam na fragilidade capilar, bem como propriedades anti-inflamatórias e anti-tumorais [53,56,57].

A antocianidina, isto é, a antocianina sem a molécula de açúcar, figura 1.6, é conhecida pelo nome de aglicona ou catião flavílio. A deficiência electrónica do catião flavílio faz com que as antocianidinas sejam muito reactivas e não existam naturalmente, estando sempre esterificadas com uma ou mais moléculas de açúcar que lhes conferem estabilidade, sendo este complexo o que recebe o nome de antocianina.

Assim, uma antocianina é formada por uma aglicona (antocianidina) esterificada por uma ou mais moléculas de açúcar. Estas são as formas que existem na natureza [59].

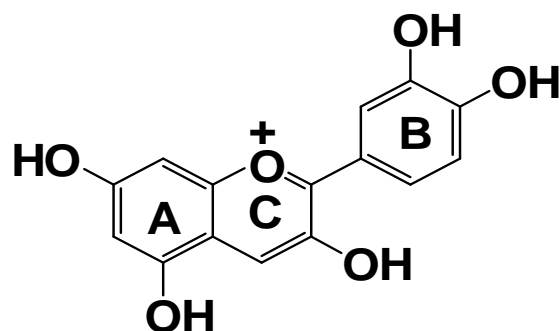


Figura 1.6– Estrutura de uma antocianidina ou aglicona, também conhecido como catião flavílio.

As antocianidinas são instáveis em água e muito menos solúveis que as antocianinas [62], por isso pensa-se que a glicosilação, proporcione estabilidade e solubilidade a estes pigmentos [58,59].

Os açúcares substituintes mais comuns nas antocianinas são a glucose, ramnose, xilose, galactose, arabinose e fructose. Nas antocianinas, tanto os substituintes 3-O-glicósido como 3,5-O-diglicósido são os dominantes, embora tenham sido encontradas glicosilações no C7, C3' e C5' [60].

Os resíduos dos açúcares das antocianinas podem ser acilados com um ou mais grupos de ácidos alifáticos como os ácidos malónico, acético, málico, oxálico, e ácidos fenólicos benzóicos ou fenólicos cinâmicos incluindo o *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico e gálico.

Os grupos substituintes das antocianinas geralmente influenciam a sua reactividade e a cor por variações da distribuição electrónica. A cor das antocianinas também está condicionada pelas condições físico-químicas do meio.

Geralmente a cor varia do vermelho ao azul com o aumento dos grupos hidróxilo, observando-se o efeito inverso quando se substituem estes grupos por grupos metóxilo.

Para um determinado pH as antocianinas-3-glucósido são mais coradas que as antocianinas-3,5-diglicósido ou as antocianinas-5-glucósido [53]. Da mesma forma as antocianinas podem ser coradas ou incolores consoante o pH do meio, concentração e presença ou não de copigmentos [58]. Vários estudos foram realizados sobre a estabilidade da cor das antocianinas em função do pH em solução aquosa [55,61-64].

As antocianinas são solúveis em solventes polares, e são comumente extraídas das plantas com metanol contendo pequenas quantidades de ácido clorídrico ou ácido

fórmico [65]. O ácido diminui o valor do pH da solução prevenindo a degradação dos pigmentos de antocianina não acilada.

De qualquer modo, pequenas quantidades de ácido podem sofrer parcial ou total hidrólise dos grupos acilo das antocianinas aciladas presentes em algumas plantas [73].

1.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO COM DETECÇÃO ELECTROQUÍMICA

Cromatografia, em todas as suas variantes, é um método de separação de componentes de uma mistura em que a separação depende da distribuição das diferentes moléculas entre duas fases: uma fase estacionária e uma fase móvel. Os métodos cromatográficos classificam-se de acordo com a natureza da fase estacionária e fase móvel, os seus estados físicos e os mecanismos de separação [66].

Em cromatografia líquida, a fase móvel é um líquido que escoar ao longo da fase estacionária numa direcção definida. Os compostos que são fracamente retidos pelo sorbente da fase estacionária escoam mais rapidamente ao longo do enchimento, enquanto os que estabelecem interacções mais fortes com a fase estacionária saem mais lentamente até à separação completa dos componentes duma mistura.

O processo de escoamento dos compostos, que são arrastados pela fase móvel ao longo da coluna até à saída, designa-se por eluição [67]. O detector regista o resultado na forma de um cromatograma, tal como é mostrado na figura 1.7.

Assim, um cromatograma é a resposta do detector na forma de gráfico, representando a concentração de analíto no efluente (também pode ser qualquer outra medida de quantidade) em função do tempo ou do volume de eluição.

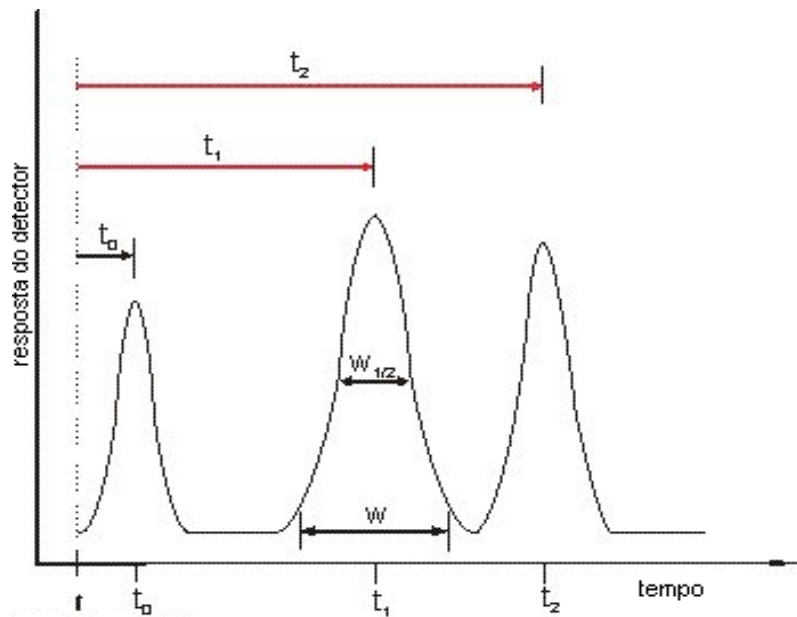


Figura 1.7. Esquema geral de um cromatograma líquido onde dois picos são eluídos da coluna.

De um cromatograma podem obter-se vários parâmetros que caracterizam a separação:

- t_0 (tempo morto da coluna): também conhecido como o tempo extra da coluna, é o tempo que demora um soluto que não foi retido na coluna para ser eluído, isto é, um composto que é insolúvel ou não é adsorvido na fase estacionária.
- t_R (tempo de retenção): é o tempo que demora um soluto a ser totalmente eluído da coluna. Na figura 1.7 estão representados por t_1 e t_2 a resposta para dois solutos diferentes.
- $w_{1/2}$: largura do pico a meia altura.
- w (largura da banda do pico): resultante da intersecção das duas tangentes aos pontos de inflexão do pico.
- $\alpha = t'_{R2}/t'_{R1}$ (**factor de separação**): parâmetro termodinâmico que mede a retenção relativa de dois compostos e descreve a capacidade do método para separá-los. Depende da fase estacionária, da temperatura e da fase móvel seleccionadas sendo independente do fluxo.
- $R_s = (t_{R2} - t_{R1}) / ((w_1 + w_2) / 2)$ (**resolução**): é a medida que determina que dois picos adjacentes estão completamente separados. Quando R_s é igual a 1,5 pode dizer-se que a separação entre os picos é quase completa e eles estão sobrepostos menos de 1%. Um valor de resolução superior a 2 entre o pico de interesse e o pico vizinho mais próximo é o ideal para o método ser

robusto. Numa cromatografia isocrática a resolução diminui ao aumentar a velocidade do fluxo e aumenta quando este diminui.

- $k=(t_R-t_0)/t_0=(t'_R/t_0)$ (**factor de retenção**): é um parâmetro termodinâmico que fornece uma medida relativa do tempo que o analito reside na fase estacionária e na fase móvel, é específico de cada substância, e depende de vários factores, como a fase estacionária, a fase móvel, a temperatura, etc.

A **cromatografia líquida de alta eficiência**, (*HPLC, High Performance Liquid Chromatography*), iniciou-se na década dos anos 60. É uma extensão da cromatografia líquida clássica e está caracterizada pelo uso de colunas em aço inox muito mais estreitas, com diâmetro interno de 2-5 mm, empacotadas com partículas de tamanho muito pequeno, 3-10 μm , que constituem a fase estacionária. A fase móvel circula sob alta pressão ao longo da coluna com um fluxo controlado. A alta pressão permite análises mais rápidas e o uso de fases estacionárias constituídas por micro partículas permite uma elevada eficiência na separação [66].

A técnica de HPLC revelou-se um dos mais eficientes métodos cromatográficos, em virtude do desenvolvimento de instrumentação automatizada. Permite a injeção de volumes de amostra cada vez mais pequenos e reprodutíveis e a detecção de quantidades de analito cada vez menores em sistemas de detecção em fluxo que indicam quando os componentes sofrem eluição da coluna.

Esta técnica veio complementar a cromatografia de gases (GC) no tipo de compostos que podem ser separados. Apresentou também a vantagem de tempos de retenção mais curtos e maior número de análises por unidade de tempo. A introdução de colunas capilares, como em GC, oferece um maior número de pratos teóricos e uma melhor resolução do que as colunas padrão. Outra vantagem que esta técnica apresenta é a de menor quantidade de fase móvel, o que permite utilizar solventes tóxicos, raros, ou caros bem como o uso de fases estacionárias dispendiosas [66].

Assim, um sistema de HPLC consiste em quatro componentes principais: uma bomba, um sistema de injeção, uma coluna de separação e um detector, todos conectados numa instalação resistente a altas pressões, que podem ir até 300 atm.

Em geral, a técnica de HPLC é um processo dinâmico onde as moléculas dos analitos se movem através de um enchimento poroso, por acção da fase móvel

bombeada continuamente e interagem com diferentes afinidades com o material da fase estacionária.

A cromatografia líquida de alta eficiência pode ser dividida em dois grupos principais: em fase normal (*HPLC-NP*) e em fase reversa (*HPLC-RP*).

Na cromatografia em fase normal uma fase estacionária polar (normalmente sílica) é usada para a retenção dos analitos polares. As separações em fase reversa estão baseadas em forças atractivas entre solutos não polares e grupos funcionais não polares ligados a um suporte de sílica.

A maioria das separações são levadas a cabo por HPLC de fase reversa devido ao seu maior campo de aplicação que por fase normal pois existem muito poucos compostos que sejam retidos permanentemente na coluna. As colunas também tendem a ser mais robustas [68].

Para um soluto ser retido por um sistema cromatográfico deve ser transferido da fase móvel para a fase estacionária. A associação do soluto com a fase estacionária pode envolver partição, adsorção ou uma combinação de ambas.

Num processo por partição, o soluto está praticamente todo embebido na fase estacionária enquanto num processo por adsorção o soluto está apenas em contacto superficial com a fase estacionária e não totalmente embebido nela. Esses dois processos foram usados para desenvolver as duas teorias principais que descrevem o mecanismo de retenção molecular em HPLC-RP [69].

Na fase reversa existe uma relação exponencial entre o factor de retenção k e a fracção do volume do solvente orgânico na fase móvel. Um erro de 1% na quantidade de solvente orgânico pode fazer variar o t_R entre 5% e 15% [70].

Quando a composição da fase móvel é alterada gradualmente ao longo da eluição cromatográfica, por aumento e posterior diminuição da percentagem de metanol fala-se de uma eluição em gradiente. Nos casos em que a composição da fase móvel se mantém constante durante toda a análise o tipo de eluição é conhecido como isocrático.

Pode dizer-se que, nas cromatografias em fase reversa, os compostos apolares ou fracamente polares são mais fortemente retidos na fase estacionária do que na fase móvel. A retenção de um composto na fase estacionária é tanto maior quanto menor é a sua solubilidade na fase móvel.

Um detector de HPLC deve seguir os seguintes requisitos [71]:

- Suficiente sensibilidade
- Limite de detecção suficientemente baixo
- Amplo intervalo dinâmico linear
- Suficiente estabilidade e reprodutibilidade do sinal
- Resposta do sensor rápida
- Ligação entre a coluna e o detector curta e directa
- Detector com volume morto tão pequeno quanto possível

Existem outras características que afectam a aplicabilidade do detector, por exemplo, se é pretendido que o detector mostre a mesma sensibilidade para todos os solutos detectados, e que o sinal seja o menos possível influenciado pela temperatura, a velocidade do fluxo e a composição da fase móvel.

A electroquímica oferece um grande grupo de métodos que podem ser usados para a contínua detecção de substâncias. Para a técnica de HPLC, os detectores electroquímicos mais utilizados são o amperométrico e o coulométrico.

O facto de poder combinar o alto poder de resolução da cromatografia líquida de alta eficiência com a alta sensibilidade da detecção electroquímica através de células de fluxo faz com que seja uma das mais poderosas técnicas bioanalíticas disponíveis [72].

A detecção electroquímica (ED) baseia-se na propriedade de um composto para sofrer uma oxidação ou redução num eléctrodo a um potencial aplicado. A velocidade da reacção electroquímica é observada como uma corrente, e, por isso essas técnicas são conhecidas por amperometria, que, literalmente, significa medida de corrente em amperes (A).

Em HPLC-ED, a fase móvel do sistema cromatográfico, que actua como electrólito de suporte, passa através da célula electroquímica. O analíto na forma reduzida é então oxidado, ou vice-versa, e a corrente resultante é monitorizada em função do tempo. Os compostos separados são observados como picos onde a altura de cada pico é proporcional à concentração de cada analíto.

É necessário um potenciostato de três eléctrodos para um controlo preciso do potencial aplicado. O transdutor confina os eléctrodos de trabalho, auxiliar e de referência num pequeno volume, que é tipicamente inferior a 20 μL [72].

DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES POR HPLC

A técnica de HPLC foi utilizada pela primeira vez para a determinação de flavonóides em 1976 por Fischer e Wheaton [73]. Com o passar dos anos muitas técnicas diferentes foram propostas para a separação e determinação de flavonóides e compostos fenólicos em geral. A maioria desses métodos estão baseados na técnica de HPLC, devido à sua versatilidade, precisão e custo relativamente baixo. Esta técnica é normalmente utilizada em conjunção com métodos de detecção de absorção por Ultravioleta-Visível [74,75], DAD-Ultravioleta [76,77], fluorescência [78] e Espectrometria de massa [79].

Em geral, as separações deste tipo de compostos são obtidas em colunas de fase reversa C_{18} , e as diferenças nas características dos métodos de identificação e quantificação estão associadas com o sistema de detecção.

Muitos são os métodos espectrofotométricos utilizados para a quantificação de compostos fenólicos. No entanto, existem várias dificuldades associadas a esse tipo de metodologias sendo a sua utilidade frequentemente questionada.

A diversidade de compostos fenólicos implica a selecção de um solvente e/ou um comprimento de onda de absorção que são arbitrárias [80].

Outra desvantagem importante de medidas directas por espectrofotometria pode ser atribuída à falta de selectividade desses métodos, principalmente porque é sobrestimado o teor fenólico [81].

Os métodos cromatográficos com detecção electroquímica (HPLC-ED), bem conhecidos pela sua capacidade para detectar quantidades vestigiais de muitos componentes em matrizes complexas devido à sua elevada selectividade e sensibilidade [82], são de particular interesse para a análise de antioxidantes, já que todos estes compostos são electroactivos [83-85].

Nas separações de flavonóides levadas a cabo em fase reversa, espera-se uma eluição que começa pelos compostos mais polares e acaba nos compostos menos polares. Assim, de um modo geral, os primeiros compostos a sair da coluna cromatográfica serão os que pertencem à subclasse dos flavanóis, as catequinas e as epicatequinas. De seguida sairão as antocianinas e depois os compostos membros das subclasses dos flavanóis, flavonas e flavanonas. A polaridade do anel básico das últimas

três subclasses é muito similar, mas a adição de grupos hidróxilo à estrutura do anel B resulta numa alteração substancial da polaridade da molécula [76].

1.5 APLICAÇÃO

As **uvas** são consideradas uma das maiores fontes de compostos fenólicos quando comparadas com outras frutas e vegetais. Porém a grande diversidade de culturas resultam em uvas com diferentes características, tanto de sabor quanto de coloração, o que certamente está associado com o conteúdo e o perfil dos polifenólicos. Por ser a matéria-prima para a produção de vinhos e sumos, é importante conhecer os teores de compostos fenólicos das uvas, pois estes podem influenciar a qualidade dos produtos finais.

De acordo com muitos estudos científicos existe um consenso em torno da ideia que uma dieta rica em antioxidantes reduz o risco do Homem contrair um sem número de patologias crónicas. A acção dos antioxidantes é fundamental, uma vez que, inactivam compostos reactivos de oxigénio (com radicais livres), originados pela redução do oxigénio molecular (respiração celular). Os referidos radicais livres actuam sobre os hidratos de carbono, proteínas, vitaminas e lípidos, presentes em conjunto ou em separado, na alimentação humana [84-88].

CAPÍTULO 2

EXPERIMENTAL

2.1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo apresenta-se uma descrição dos reagentes, soluções, métodos de investigação, instrumentação, tratamento de dados e condições experimentais utilizadas.

2.2 REAGENTES E MATERIAIS

Os reagentes utilizados foram:

- ✓ Morina hidratada, 2',3,4',5,7-pentahidroxiflavona, de 95% de pureza; rutina, 3',4',5,7-tetrahidroxiflavona-3 β -D-rutinoose 98% puro; (+)-catechin hydrate, 98% puro (catequina); quercetina, 3',4',3,5,7-pentahidroxiflavona 98% puro; foram adquiridos à Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha;
- ✓ Oenin chloride (oenina); kuromanin chloride (kuromanina); myrtilin chloride (mirtilina); fisetin (fisetina) e delphinidin chloride (delfinidina) foram obtidas da Extrasynthèse, França;
- ✓ Metanol (CH₃OH), com grau de pureza para HPLC, foi adquirido da Merck e o ácido fórmico (HCO₂H) foi da Panreac, Barcelona, Espanha.

As fases móveis utilizadas para HPLC e as soluções padrão dos flavonóides foram preparadas em água desionizada ultrapura obtida pelo sistema Millipore Milli-Q System (condutividade < 0,1 μ S cm⁻¹), Millipore S.A., Molsheim, França. As soluções padrão dos flavonóides foram preparadas na fase móvel A.

Na medição de μ -volumes (20-1000 μ L) para preparar as diferentes soluções foram utilizadas micropipetas Gilson, SAS.

SOLUÇÕES E FASES MÓVEIS UTILIZADAS

Neste trabalho foram usadas duas fases móveis. As fases móveis utilizadas nas análises efectuadas por HPLC foram: a fase móvel A constituída por 83% de água, 16% de metanol e 1% de ácido fórmico, e a fase móvel B constituída por 68,5% de água, 30% de metanol e 1,5% de ácido fórmico. Também foi adicionado, a cada fase móvel, KCl 1 M, necessário para garantir a estabilidade do eléctrodo ISAAC de quase-referência da célula electroquímica (ver secção 2.4.2.2).

O pH final da fase móvel A foi 2,15 e da fase móvel B foi 2,11.

EQUIPAMENTOS E INSTRUMENTAÇÃO

O equipamento de HPLC-ED, figura 2.1A, consiste num cromatógrafo “Waters 2690 Alliance” acoplado a um detector espectrofotométrico de fotodiodos, “Photodiode Array Detector 996” (PDA 996) da Waters S.A., U.S.A., por sua vez ligado em série com um detector electroquímico “CONCORDE Electrochemical Detector”, de Antec Leyden, Holanda, figura 2.1B.

Coluna guarda e coluna analítica

Foram escolhidas uma coluna guarda e uma coluna analítica com dimensões e características apropriadas para a separação de flavonóides. A coluna analítica foi uma C₁₈ de fase reversa, Inertsil ODS-3V de Inertsil.

As dimensões da coluna analítica são 150x4,6 mm. A fase estacionária é constituída por partículas de 5 µm de diâmetro e poros de 100 Å. Foi colocada uma coluna guarda com as mesmas características que a coluna analítica.

Uma imagem da coluna analítica e da coluna guarda colocadas no sistema pode ser observada na figura 2.1B.

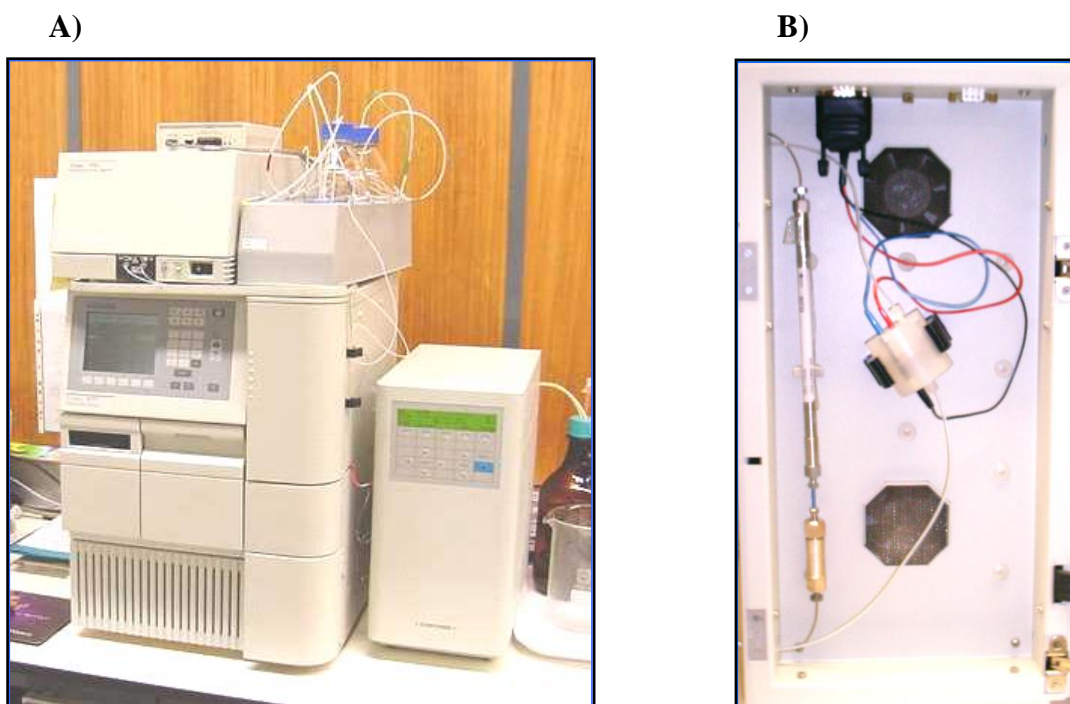


Figura 2.1- (A) Equipamento de HPLC: (1) Carrossel de colocação das amostras, (2) Detector electroquímico. (B) Imagem do interior do detector electroquímico: (1) Coluna guarda, (2) Coluna analítica, (3) Célula electroquímica.

Célula electroquímica e condições de medida

Na detecção por amperometria foi utilizada uma célula electroquímica VT-03 com uma configuração wall-jet, fig. 2.1B. A célula é formada por um eléctrodo de carbono vítreo com 2 mm de diâmetro utilizado como eléctrodo de trabalho, um eléctrodo de referência *in-situ* Ag/AgCl, designado por ISAAC, e um eléctrodo auxiliar de aço inoxidável. A capacidade volumétrica da célula é de 0,16 μL .

O eléctrodo de referência nesta célula é um eléctrodo quase-referência obtido pela adição de KCl 1 M à fase móvel. A diferença de potencial entre o eléctrodo de referência Ag/AgCl saturado com 3 M KCl e o eléctrodo ISAAC é de + 0,190 V. Assim, um potencial de oxidação de + 0,550 V no ISAAC corresponde a um potencial de oxidação de aproximadamente + 0,350 V *vs.* Ag/AgCl, 3M KCl.

Condições cromatográficas

Neste trabalho foram utilizadas duas fases móveis. A fase móvel A constituída por 83% de água, 16% de metanol e 1% de ácido fórmico, e a fase móvel B constituída

por 68,5% de água, 30% de metanol e 1,5% de ácido fórmico. De acordo com o comportamento voltamétrico dos flavonóides a pH 2.02, foi escolhido o potencial + 0,50 V vs. ISAAC como o mais apropriado para a detecção destes flavonóides nos extractos da película de uvas pretas, depois de diluídas 50 vezes em fase móvel A.

A eluição foi realizada em modo gradiente de fase móvel A para B dos 5 minutos para os 15 minutos a um fluxo de 1 mL/min e com um volume de injeção de 25 µL e a uma temperatura de 40°C. No ISAAC, foi fixado um valor de potencial de + 0,50 V. Este valor de potencial foi utilizado em todas as experiências cromatográficas realizadas.

A coluna guarda e a coluna analítica foram colocadas em série dentro de uma gaiola Faraday, figura 2.1B. Esta gaiola possui um forno que permite manter uma temperatura constante na coluna. A temperatura escolhida para realizar as experiências foi de 40 °C.

Todos os cromatogramas apresentados foram adquiridos no software Millennium 32 Chromatography Manager de Waters S.A. Os cromatogramas e resultados das curvas de calibração foram tratados no Microcal Origin. Também foi utilizado o Excel para tratamento de alguns dados.

CAPÍTULO 3

DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES FENÓLICOS POR HPLC-ED

3.1. INTRODUÇÃO

A cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC), possui um elevado poder de separação para amostras com matrizes complexas. A sua aplicação encontra-se dependente de um método de detecção sensível e selectivo. A associação do HPLC com a detecção electroquímica (ED) permite a obtenção de resultados de elevada selectividade.

A maioria dos procedimentos analíticos que foram desenvolvidos para o estudo de flavonóides em alimentos quantifica os flavonóides na sua forma natural, isto é, na forma glicosilada, com excepção das catequinas, que ocorrem como agliconas. Na alimentação diária é comum encontrar-se cerca de 50 flavonóides glicosilados.

Neste trabalho foi desenvolvido um procedimento para a separação e quantificação de flavonóides e das suas agliconas em três das cinco subclasses existentes: os flavonóis, as flavonas e as flavanonas.

Foi também desenvolvido um tratamento de amostra natural proveniente de películas de uvas pretas. Por fim, foi feita a determinação quantitativa de flavonóides padrão por HPLC-ED. A figura 3.1 mostra a estrutura química de alguns flavonóides presentes na película das uvas em estudo neste trabalho.

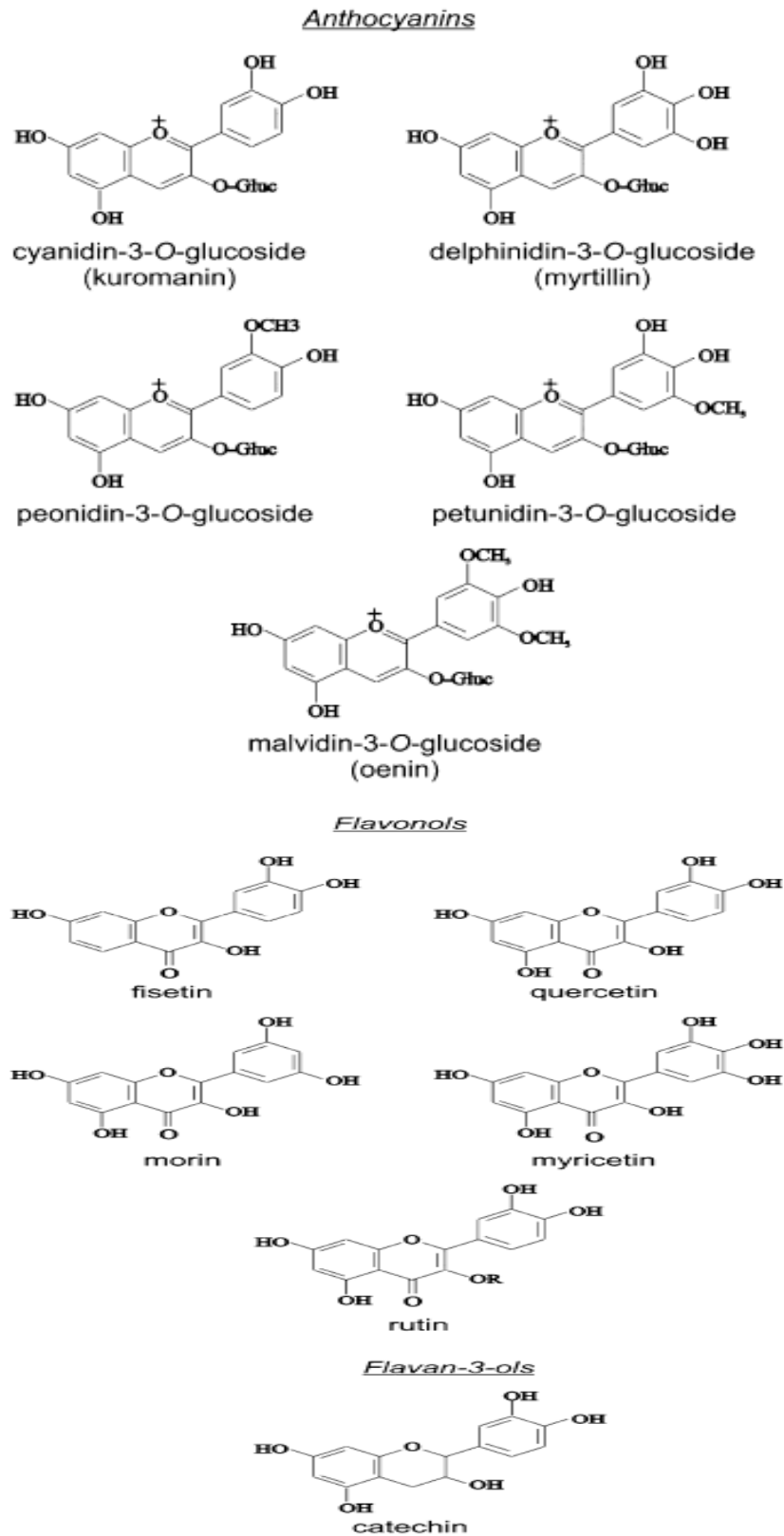


Figura 3.1- Estrutura química de alguns flavonóides presentes na película das uvas em estudo neste trabalho por HPLC-ED.

Além do detector electroquímico foi utilizado como método de comparação um detector DAD (“diode array detector”), mas não pode efectuar-se a validação do método electroquímico pois não é possível a detecção com o DAD destes compostos nas concentrações utilizadas neste trabalho.

3.2. OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

Foram feitos alguns testes de forma a otimizar a separação cromatográfica. Esses testes foram realizados com uvas de casta “Touriga Nacional”. Os resultados encontram-se na tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Condições experimentais que foram utilizadas nos testes para optimização das condições experimentais.

T/°C	Eluição em gradiente	Volume de injeção/μL
25	Fase móvel A para B, 7,5 min a 10,5 min	25
40		50
25	Fase móvel A para B, 7,5 min a 15,5 min	25
40		50
25	Fase móvel A para B, 5 min a 15 min	25
40		50
25	Fase móvel A para B, 11 min a 21 min	25
40		50

3.3. DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES PADRÃO POR HPLC-ED

Foi feito um estudo por HPLC-ED a um potencial constante de + 0.50 V de vários flavonóides padrão: a delphinidina (1), a catequina (2), a myrtillina (3), a epicatequina(4), a kuromanina (5), a peonidina (6), a petunidina (7), a oenina (8), a rutina (9), a myricetina (10), a fisetina (11), a morin (12) e a quercetina (13), todos com

concentração de $1\mu\text{M}$, numa determinação com eluição de gradiente de duas fases móveis: a fase móvel A constituída por 83% de água, 16% de metanol e 1% de ácido fórmico, e a fase móvel B constituída por 68,5% de água, 30% de metanol e 1,5% de ácido fórmico (fase móvel A, 5 minutos, seguida de fase móvel B, 15,5 minutos), à temperatura de 40°C , com um volume de injeção de $25\mu\text{L}$ e um fluxo de 1 mL/min .

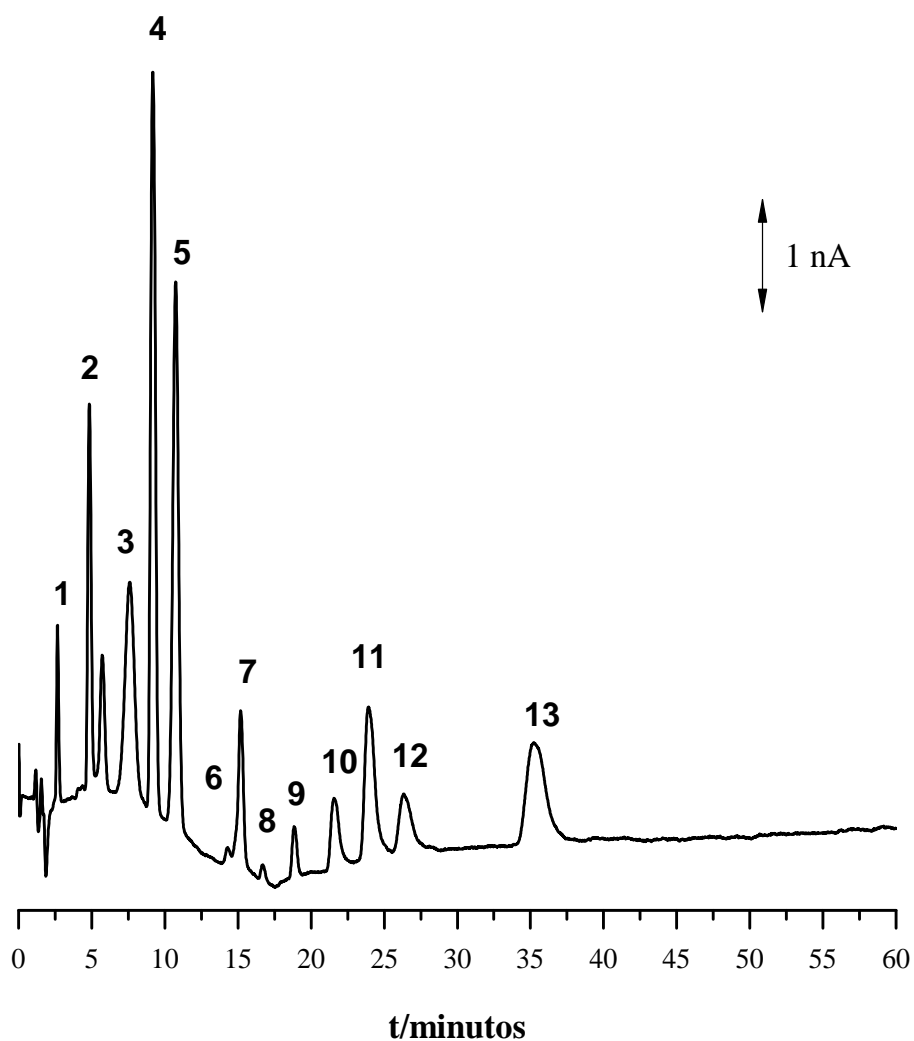


Figura 3.2 - Cromatograma obtido de mistura de padrões.

De acordo com o cromatograma da figura 3.2, foi possível identificar os flavonóides padrão e os seus respectivos tempos de retenção (tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Identificação dos flavonóides padrão e os respectivos tempos de retenção.

	Flavonóides	t_R/minutos
1	Delphinidin	2,5
2	Catechin	5
3	Myrtillin	7,5
4	Epicatechin	8
5	Kuromanin	11
6	Peonidin	14
7	Petunidin	15
8	Oenin	16
9	Rutin	19
10	Myricetin	22
11	Fisetin	24
12	Morin	27,5
13	Quercetin	35

Para a realização das curvas de calibração foram preparadas soluções stock de concentração 1 µM de vários flavonóides. A partir destas soluções utilizaram-se os volumes necessários para preparar soluções de concentração diferente na fase móvel A.

Para calcular a precisão do método avaliou-se a dispersão de 5 injeções de cada padrão. As curvas de calibração foram realizadas a partir do estudo cromatográfico de cada padrão individualmente.

Depois da injeção de diferentes concentrações do composto num volume de 25 µL foi obtida a curva de calibração para cada um dos flavonóides. Os resultados correspondentes a essas curvas estão apresentados na tabela 3.3, a equação: altura do pico/nA = A + B*[flavonóide]/nM.

A equação da recta de calibração permitiu calcular os coeficientes de correlação, R², obtendo-se valores muito próximos da unidade, o que indica que a curva

tem um comportamento linear e directamente proporcional. Na tabela 3.3 encontram-se sumariados os parâmetros obtidos nas regressões lineares destas curvas de calibração.

Os parâmetros para definir a sensibilidade do método são o limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ). O limite de detecção, expresso como a concentração, c_L , ou a quantidade, q_L , é derivado da mais pequena medida, x_L , que pode ser detectada com razoável certeza para um processo analítico.

O mais baixo limite de detecção pode ser entendido como o limite abaixo do qual a detecção não é possível com um grau específico de certeza, deve corresponder a uma concentração que, com uma grande probabilidade, dará sinais que podem ser distinguidos dos sinais obtidos do branco.

Tabela 3.3 - Coeficientes de regressão, coeficientes de correlação e equações da curva para cada flavonóide.

Analíto	Equação da curva/nA	SD/nM	N	P	R ²
Catechin	$y=0,05998+0,01435x$	0,06292	6	0,0007e-4	0,9567
Fisetin	$y=0,0046+0,00113x$	0,00507	6	0,00078e-4	0,9548
Quercetin	$y=-0,00184+0,00303x$	0,00797	6	<0,0001	0,9839
Rutin	$y=0,01306+0,00297x$	0,00778	6	<0,0001	0,9841
Kuromanin	$y=0,11804+0,03172x$	0,12580	6	0,00048e-4	0,9643
Myrtillin	$y=0,04041+0,01017$	0,04358	6	0,00065e-4	0,9586
Delphinidin	$y=0,53315+0,00367x$	0,02083	5	0,01144	0,9117
Oenin	$y=-0,00415+0,00589x$	0,01213	6	<0,0001	0,9901

É definido o limite de quantificação (LOQ) como a concentração mais pequena de uma substância que pode ser determinada usando uma precisão analítica expressa como o intervalo de confiança relativo.

Estes valores foram calculados usando as seguintes equações [97]:

- ✓ **LOD** = 3,3 x SD/declive
- ✓ **LOQ** = 10 x SD/declive

Os limites de detecção bem como os limites de quantificação para cada composto analisado são mostrados na tabela 3.4. Pela tabela é possível concluir que a oenina apresenta o limite de detecção mais baixo de todos os compostos estudados. As rectas de calibração obtidas para os quatro flavonóides permitiram calcular o limite de detecção e limite de quantificação associados à detecção amperométrica para o potencial de + 0,50 V.

Tabela 3.4- LOD e LOQ para quatro flavonóides determinados por HPLC com detecção amperométrica a um potencial de + 0,50 V.

Analíto	LOD/nM	LOQ/nM
Catechin	14,469	43,847
Fisetin	14,806	44,867
Quercetin	8,680	26,304
Rutin	8,644	26,195
Kuromanin	13,088	39,659
Myrtillin	14,141	42,851
Delphinidin	18,730	56,757
Oenin	6,796	20,594

Os dados da tabela 3.4 mostram que a detecção amperométrica dos flavonóides estudados a + 0,50 V apresenta um LOD inferior a 20 nM.

3.4 ESTUDO DOS ANTIOXIDANTES PRESENTES NA PELÍCULA DAS UVAS PRETAS

As películas das uvas estudadas foram cedidas pelo Eng. Ricardo Reis, da empresa Vinhos Lapa dos Reis, Podentes, Penela, Portugal. A colheita das mesmas também foi efectuada por ele.

Tabela 3.5 – Correspondência entre os extractos e a data da colheita.

	Colheita
1ºextracto	8.8.2009
2ºextracto	15.8.2009
3ºextracto	20.8.2009
4ºextracto	22.8.2009
5ºextracto	2.9.2009
6ºextracto	3.9.2009
7ºextracto	5.9.2009

A colheita foi feita a partir do início de Agosto, todas as semanas até às vindimas. Foram colhidos 20 bagos do mesmo pé de videira da casta Touriga Nacional e congelados. As datas das colheitas estão na tabela 3.5.

3.4.1 Método de extracção dos antioxidantes presentes na película das uvas pretas

Neste trabalho foi desenvolvido um novo método para a extracção dos antioxidantes presentes na película das uvas pretas.

Foram testadas várias condições experimentais e optimizada a extracção dos antioxidantes presentes na película de uvas, tabela 3.6.

Tabela 3.6 – Condições experimentais de forma a otimizar a extracção dos antioxidantes na película das uvas.

Microondas	Diluição
Com	Em fase móvel A
Sem	Em fase móvel A
Com	Em fase móvel B
Sem	Em fase móvel B

Método de extracção dos antioxidantes presentes na película das uvas pretas:

- As uvas foram armazenadas no congelador até a extracção ser realizada. Antes de serem usadas, descongelam-se os bagos e determina-se a massa total de 10 bagos de uva de tamanho semelhante.
- As peles foram retiradas com a ajuda de uma pinça e esmagadas com um pilão, sendo posteriormente pesadas. A polpa e as sementes foram descartadas.
- Para facilitar a quebra das ligações, à medida que se vão esmagando as peles, vai-se colocando as mesmas no microondas, a uma potência de 450 W durante 30 segundos (repete-se este processo até as peles estarem bem esmagadas).
- A extracção dos flavonóides das peles das uvas vermelhas foi realizada por ultra-sons, utilizando ácido clorídrico em metanol como solvente de extracção.
- As peles esmagadas foram pesadas e misturadas com 3 mL MeOH/HCl (99:1 em volume).
- As amostras foram colocadas em frascos protegidos da luz com folha de alumínio, que foram imersos num banho de ultra-som à temperatura ambiente, com frequência de 42 kHz, durante 15 minutos.
- Depois retiraram-se as amostras do banho de ultra-som e foram deixadas à temperatura ambiente durante 1 hora.
- O extracto foi centrifugado a 3500 rpm durante 20 minutos, para posteriormente ser colocado no congelador.
- As peles restantes foram novamente misturadas com 3 mL MeOH/HCl e submetidas ao tratamento de ultra-som, durante 30 minutos, e depois foram deixadas à temperatura ambiente durante 1 hora.

- O extracto foi novamente centrifugado e colocado no congelador.
- As peles remanescentes foram misturadas com 3 mL da solução de extracção durante 15 minutos no banho de ultra-som e deixadas em repouso durante 30 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas e o terceiro extracto colocado no congelador.
- As 3 porções de extractos foram misturadas e o volume de extracto foi medido.
- Antes da análise por HPLC, os extractos foram filtrados utilizando 0,45- μ syringe e, adequadamente, diluídos na fase móvel A [89-96].

3.4.2 Aplicação do método HPLC-ED à determinação de antioxidantes em películas de uvas pretas

Nas figuras 3.3 a 3.10 encontram-se os resultados obtidos utilizando a eluição em gradiente óptima: fase móvel A, 5 min, seguida de B, 15,5 min, por análise de HPLC-ED.

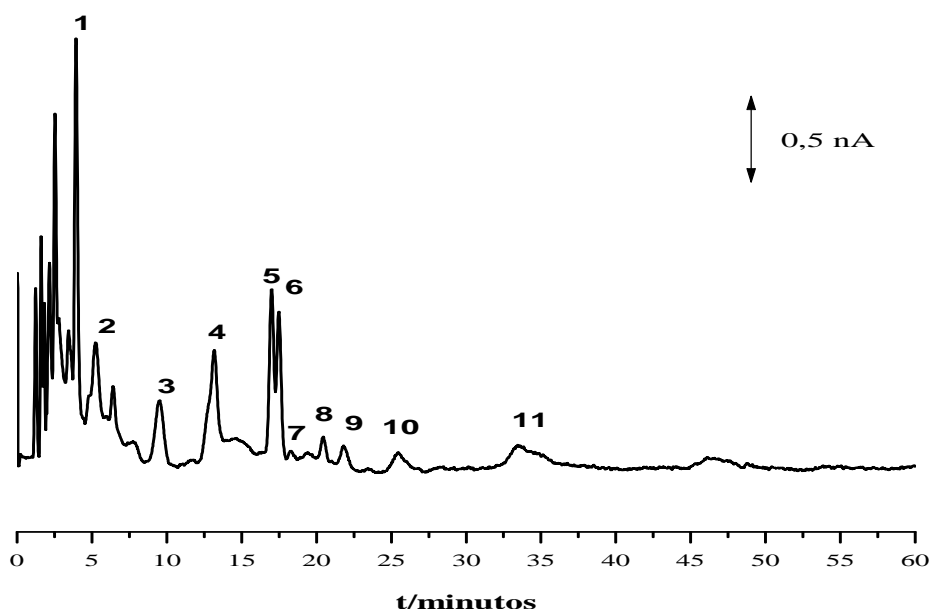


Figura 3.3 – Cromatograma obtido do 1º extracto de uvas.

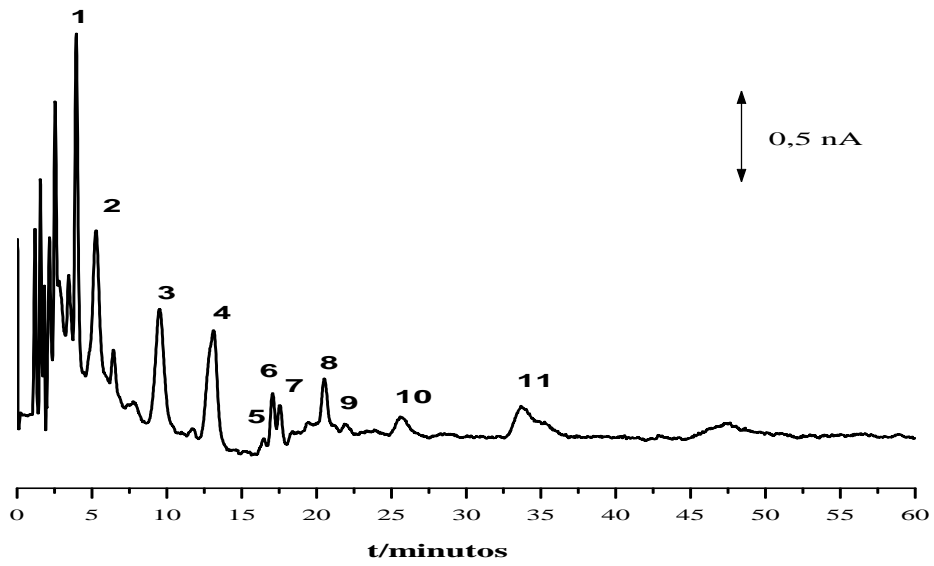


Figura 3.4- Cromatograma obtido do 2ºextracto de uvas.

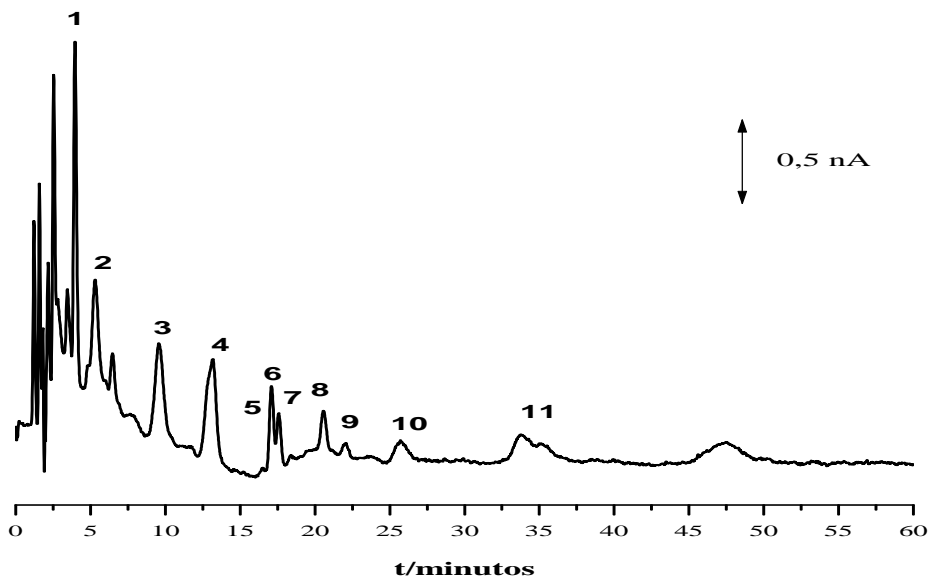


Figura 3.5 – Cromatograma obtido do 3ºextracto de uvas.

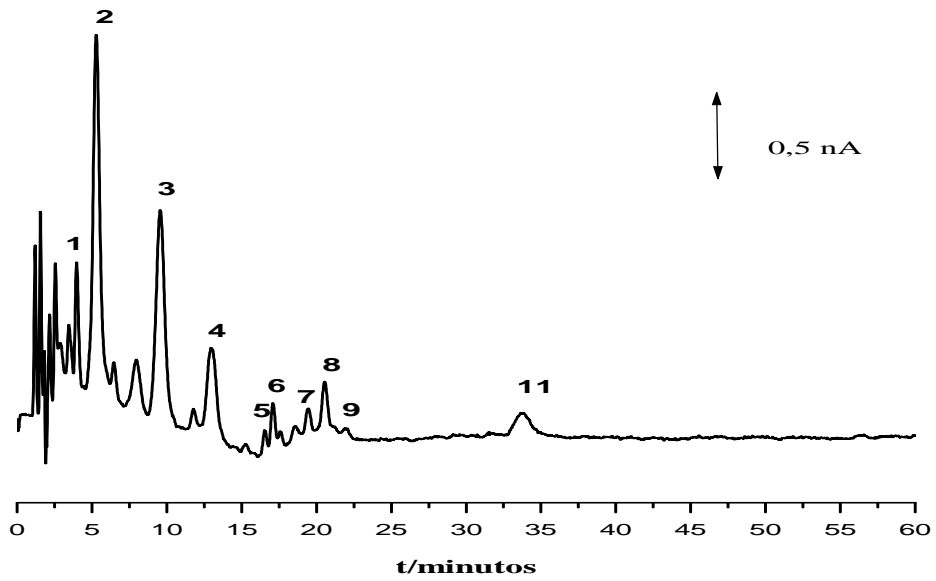


Figura 3.6- Cromatograma obtido do 4º extracto de uvas.

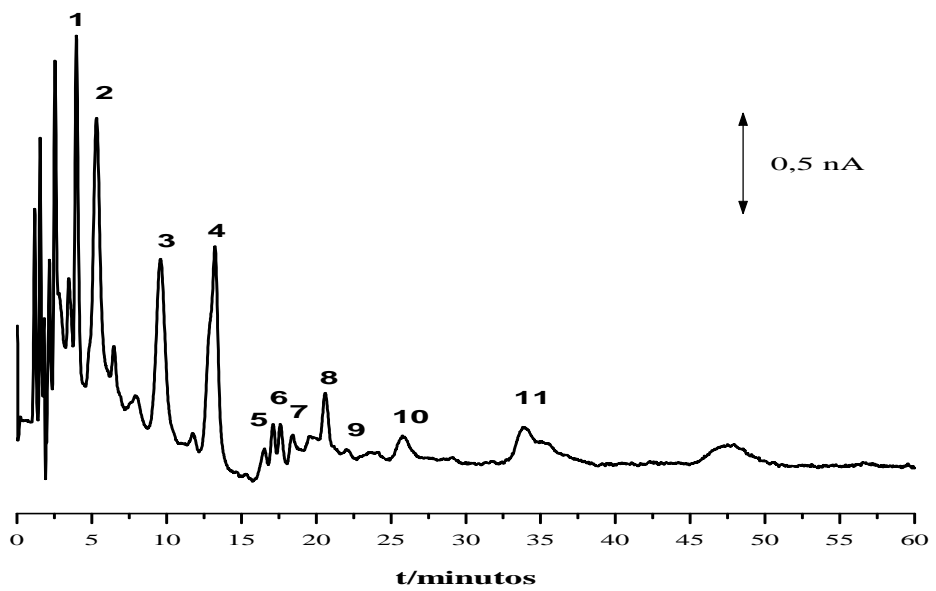


Figura 3.7 – Cromatograma obtido do 5º extracto de uvas.

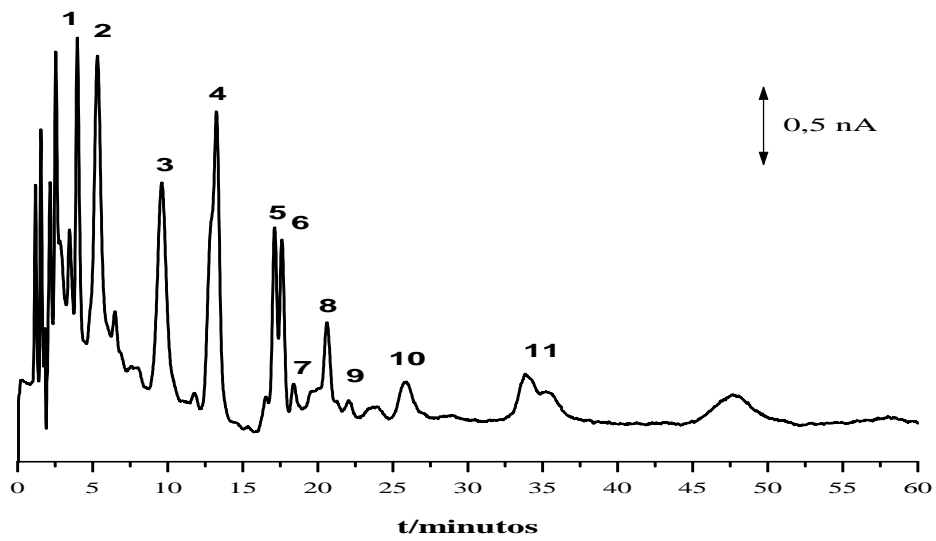


Figura 3.8- Cromatograma obtido do 6º extracto de uvas.

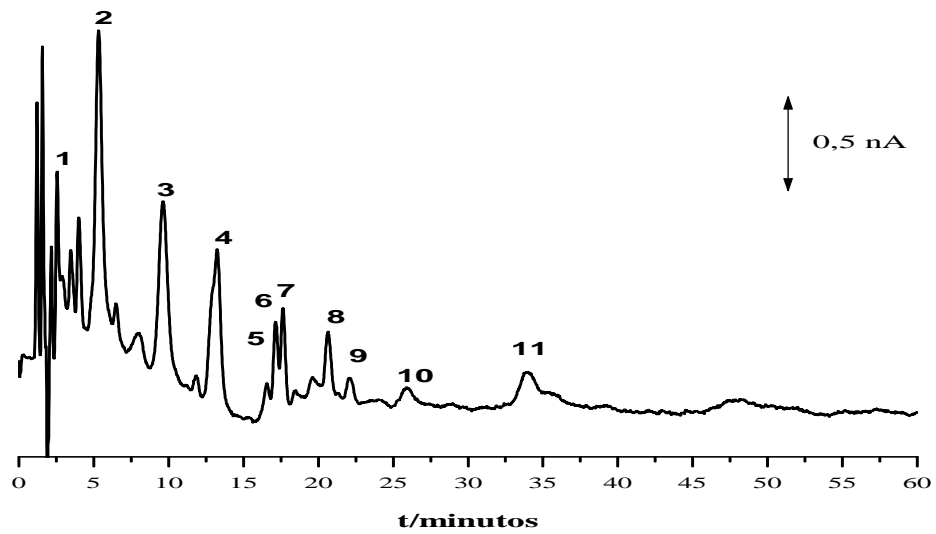


Figura 3.9 – Cromatograma obtido do 7º extracto de uvas.

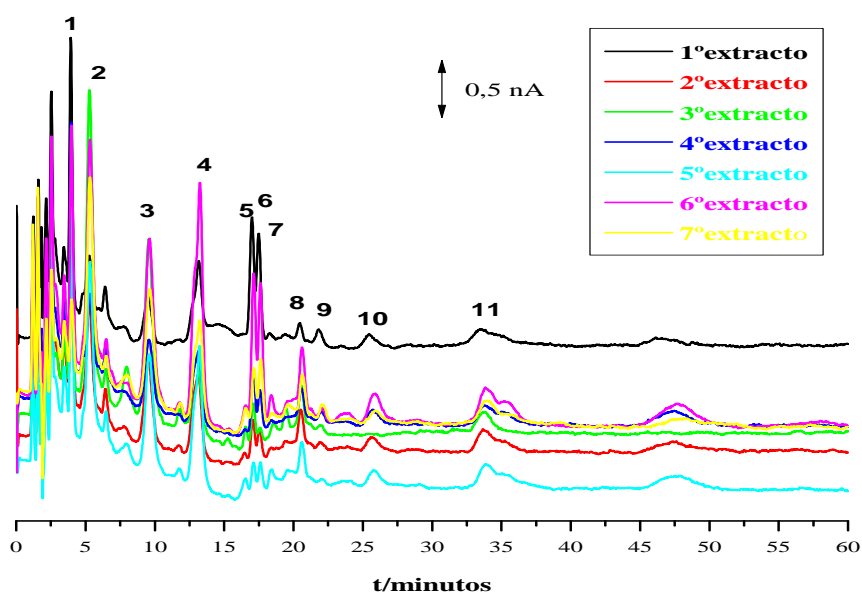


Figura 3.10 - Cromatograma obtido dos vários extractos de uvas estudada.

Na tabela 3.7, estão identificados os tempos de retenção (t_R) obtidos para cada flavonóide presentes nas películas de uvas em estudo.

Tabela 3.7 – Identificação dos flavonóides e os seus respectivos tempos de retenção (t_R).

	Flavonóides	t_R/minutos
1	Delphinidin	2,5
2	Catechin	5
3	Myrtillin	8,5
4	Kuromanin	12,5
5	Peonidin	16
6	Petunidin	17
7	Oenin	18
8	Rutin	20
9	Myricetin	22
10	Fisetin	25
11	Quercetin	34

Em suma, podemos concluir que a maior quantidade e o maior número de flavonóides encontrava-se no 6º extracto das películas de uvas Touriga Nacional.

Na figura 3.11 podemos ver um gráfico representativo da intensidade de quatro flavonóides presentes nas películas das uvas para cada data de colheita.

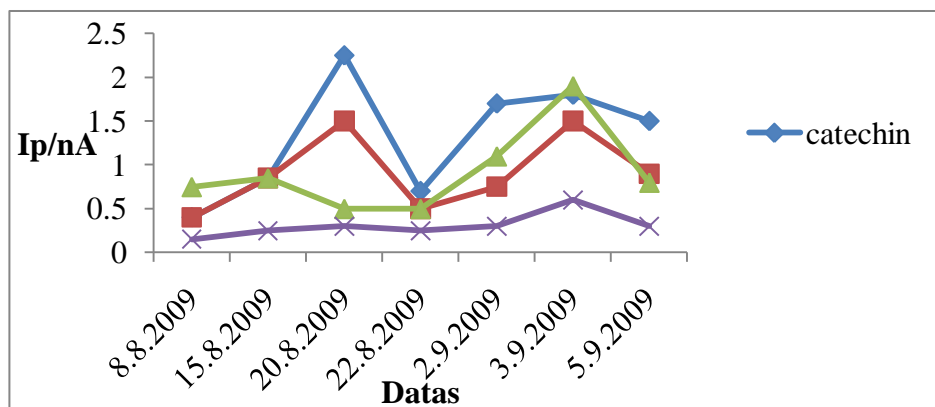


Figura 3.11 – Gráfico que ilustra a relação entre Intensidade com a data da colheita de alguns flavonóides (catechin, myrtillin, kuromanin e rutin).

Posteriormente, foi feito também um estudo de películas de uvas Moscatel compradas num supermercado. Este estudo foi efectuado nas mesmas condições que o anterior mas foi diluído 10 vezes em fase móvel A.

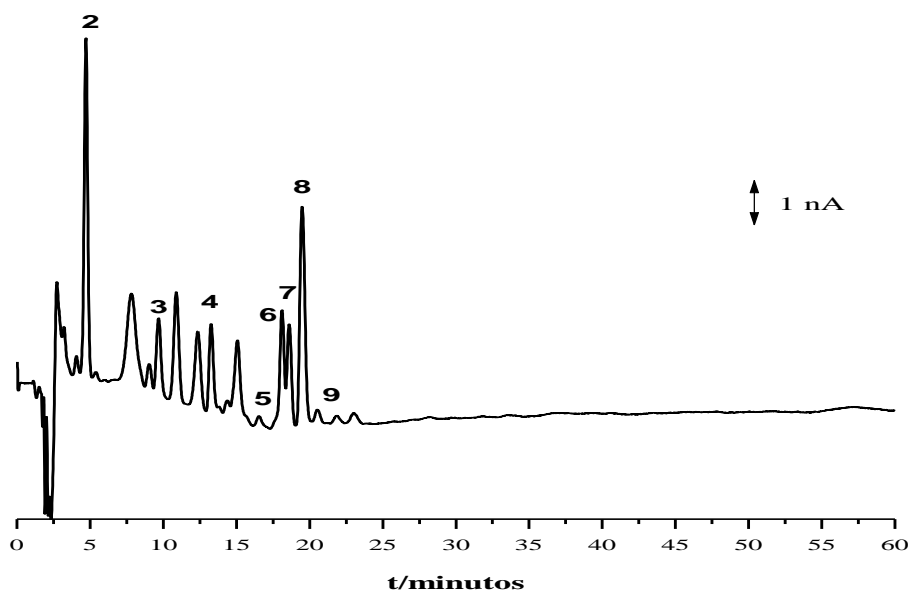


Figura 3.12 - Cromatograma obtido do extracto de uvas Moscatel.

De acordo com a figura 3.12, podemos verificar que as uvas Moscatel contêm alguns flavonóides comuns às uvas Toutiga Nacional. São eles: catechin, myrtillin, kuromanin, peonidin, petunidin, oenin, rutin e myricetin. Verificamos que existem outros mas não foi possível identificá-los.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho foi desenvolvido um método electroanalítico para a determinação de vários flavonóides, por *HPLC* com detecção electroquímica aplicando um potencial constante de + 0,50 V numa determinação com eluição de gradiente. As duas fases móveis foram: a fase móvel A constituída por 83% de água, 16% de metanol e 1% de ácido fórmico, e a fase móvel B constituída por 68,5% de água, 30% de metanol e 1,5% de ácido fórmico, com um volume de injeção de 25 μ L, um fluxo de 1 mL/min e a uma temperatura de 40°C. Os limites de detecção obtidos para os estes oito analítos foram inferiores a 20 nM.

Foi também desenvolvida e otimizada uma metodologia para a extracção dos antioxidantes fenólicos em películas de uvas utilizando microondas e ultra-sons.

A análise de HPLC-ED mostrou que são muitos os flavonóides presentes nas películas das uvas. No entanto, foi possível identificar onze flavonóides nas películas de uvas Touriga Nacional; que são: a delphinidina, a catequina, a myrtillina, a kuromanina, a peonidina, a petunidina, a oenina, a myricetina, a rutina, a fisetina e a quercetina, e concluir que os flavonóides estavam presentes em maior número e em quantidades mais elevadas no 6º extracto, ou seja, se as uvas tivessem sido colhidas no dia 3.9.2009, o vinho beneficiaria muito mais das propriedades antioxidantes dos flavonóides.

A determinação por HPLC-ED é altamente sensível e resulta ser adequada para a determinação qualitativa e quantitativa de flavonóides e compostos fenólicos em amostras naturais pois todos eles apresentam electroactividade e, normalmente, estão presentes nos alimentos em concentrações muito baixas não detectáveis por métodos de detecção como DAD (“diode array detector”).

CAPÍTULO 5

BIBLIOGRAFIA

- [1] Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G: **Antioxidant properties of phenolic compounds.** *Trends in plant science* 1997, 2:152-159.
- [2] Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC: **The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer.** *Pharmacol. Rev.* 2000, 52:673-751.
- [3] Havsteen BH: **The biochemistry and medical significance of the flavonoids.** *Pharmacology & Therapeutics* 2002, 96:67-202.
- [4] Visioli F, Borsani L, Galli C: **Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals.** *Cardiovascular Research* 2000, 47:419-425.
- [5] Robbins RJ: **Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology.** *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51:2866-2887.
- [6] Silva FAM, Borges F, Guimarães C, Lima JLFC, Matos C, Reis S: **Phenolic Acids and Derivatives: Studies on the Relationship among Structure, Radical Scavenging Activity, and Physicochemical Parameters.** *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48:2122-2126.
- [7] Naczki M, Shahidi F: **Extraction and analysis of phenolics in food.** *J. Chromatography A* 2004, 1054:95-111.
- [8] Conner EM, Grisham MB: **Inflammation, Free Radicals, and Antioxidants.** *Nutrition* 1996, 12:274-277.
- [9] Pannala AS, Chan TS, O'Brien PJ, Rice-Evans CA: **Flavonoid B-ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001, 282:1161-1168.
- [10] Cao G, Sofic E, Prior RL: **Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships.** *Free Radical Biol. Med.* 1997, 22:749-760.

- [11] Graf E: **Antioxidant potential of ferulic acid.** *Free Radical Biol. Med.* 1992, 13:435-448.
- [12] Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T: **Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions.** *Mutation Research* 2005, in press.
- [13] Taubert D, Breitenbach T, Lazar A, Censarek P, Harlfinger S, Berkels R, Klaus W, Roesen R: **Reaction rate constants of superoxide scavenging by plant antioxidants.** *Free Radical Biology & Medicine* 2003, 35:1599-1607.
- [14] Balasundram N, Sundram K, Samman S: **Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses.** *Food Chemistry* 2005, in press.
- [15] Gattrell M, Kirk DW: **A study of the oxidation of phenol at platinum and preoxidized platinum surfaces.** *J. Electrochem. Soc.* 1993, 140:1534-1540.
- [16] Born M, Carrupt PA, Zini R, Brée F, Tillement JP, Hostettmann K, Testa B: **Electrochemical behaviour and antioxidant activity of some natural polyphenols.** *Helvetica Chimica Acta* 1996, 79:1147-1158.
- [17] Steenken S, Neta P: **One-electron redox potentials of phenols. Hydroxy- and aminophenols and related compounds of biological interest.** *J. Phys. Chem.* 1982, 86:3661-3667.
- [18] Andreescu S, Andreescu D, Sadik OA: **A new electrocatalytic mechanism for the oxidation of phenols at platinum electrodes.** *Electrochem. Commun.* 2003, 5:681-688.
- [19] Hotta H, Sakamoto H, Nagano S, Osakai T, Tsujino Y: **Unusually large numbers of electrons for the oxidation of polyphenolic antioxidants.** *Biochimica et Biophysica Acta* 2001, 1526:159-167.
- [20] Beecher GR: **Flavonoids in Foods in Antioxidant Food Supplements in Human Health.** Edited by Packer L, Hiramatsu M, Yoshikawa T. Hardbound: Academic press; 1999.
- [21] Peterson J, Dwyer J: **Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity.** *Nutrition Research* 1998, 18:1995-2018.
- [22] Erlund I: **Review of the flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology.** *Nutr. Res.* 2004, 24:851-874.

- [23] Van Acker SABE, van der Berg DJ, Tromp MNJL, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJF, Bast A: **Structural aspects of antioxidants activity of flavonoids.** *Free Radical Biol. Med.* 1996, 20:331-342.
- [24] Beecher GR: **Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake in "The Third International Scientific Symposium on Tea and Human Health: Role of flavonoids in the diet":** Tufts University, Boston; 2002.
- [25] Taylor LP, Grotewold E: **Flavonoids as developmental regulators.** *Current Opinion in Plant Biology* 2005, 8:317-323.
- [26] Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G: **Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids.** *Free Radical Biology and Medicine* 1996, 20:933-956.
- [27] Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ: **Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes.** *Nutr. Hosp.* 2002, 17:271-278.
- [28] Evers DL, Chao CF, Wang X, Zhang Z, Huong SM, Huang ES: **Human cytomegalovirus-inhibitory flavonoids: Studies on antiviral activity and mechanism of action.** *Antiviral Research*: in press.
- [29] Harborne JB, Williams CA: **Advances in flavonoid research since 1992.** *Phytochemistry* 2000, 55:481-504.
- [30] Padilla E, Ruiz E, Redondo S, Gordillo-Moscoso A, Slowing K, Tejerina T: **Relationship between vasodilation capacity and phenolic content of Spanish wines.** *European Journal of Pharmacology* 2005, 517:84-91.
- [31] Rice-Evans C: **Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism and bioactivity.** *Free Radical Biol. Med.* 2004, 36:827-828.
- [32] Pietta PG: **Flavonoids as antioxidants.** *J. Nat. Prod.* 2000, 63:1035-1042.
- [33] Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C: **Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?** *Free Radical Biology & Medicine* 2004, 36:838-849.
- [34] Jovanovic SV, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B, Simic MG: **Flavonoids as antioxidants.** *Journal American Chemical Society* 1994, 116:4846-4851.
- [35] Jovanovic SV, Steenken S, Simic MG, Hara Y: **Antioxidant properties of flavonoids.** In *Flavonoids in Health and Disease*. Edited by Rice-Evans C, Parker L: Marcel Dekker; 1998:137-161.
- [36] Elena E. Karyakina, Darya V. Vokhmyanina, Natalya V. Sizova, Aytugan N. Sabitov, Anastasiya V. Borisova, Tatyana G. Sazontova, Yury V. Arkhipenko,

- Vsevolod A. Tkachuk, Yury A. Zolotov, Arkady A. Karyakin: **Kinetic approach for evaluation of total antioxidant activity**. *Talanta*, 2009, 80:749-753.
- [37] Nielsen SE, Young JF, Daneshvar B, Lauridsen ST, Knuthsen P: **Effect of parsley intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subject**. *Br. J. Nutr.* 1999, 81:447-455.
- [38] Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PAM: **Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications**. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001, 74:418-425.
- [39] Hassing A, Liang WX, Schwabl H, Stampfli K: **Flavonoids and tannins: plant based antioxidants with vitamin character**. *Medical Hypotheses* 1999, 52:479-481.
- [40] Rice-Evans CA: **Flavonoids antioxidants**. *Current Medicinal Chemistry* 2001, 8:797-807.
- [41] Bors W, Heller W, Michel C, Saran M: **Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies**. *Methods in enzymology* 1990, 186:343-355.
- [42] Amic D, Dadidovic-Amic D, Beslo D, Trinajstic N: **Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids**. *Croatia Chemica Acta* 2003, 76:55-61.
- [43] Beecher GR: **Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake in**. In *"The Third International Scientific Symposium on Tea and Human Health: Role of flavonoids in the diet"*; Tufts University, Boston, Edited by Sciences ASfN: 2003, 3248S-3254S.
- [44] Rimm ER, Katan MB, Ascherio A, Stampfer M, Willet W: **Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals**. *Ann. Intern. Med.* 1996, 125:384-389.
- [45] Hodnick WF, Milosavljevic EB, Nelson JH, Pardini RS: **Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids**. *Biochem. Pharm.* 1988, 37:2607-2611.
- [46] Kilmartin PA: **Electrochemical detection of natural antioxidants: principles and protocols**. *Antioxidants & Redox Signaling* 2001, 3:941-955.
- [47] Rapta P, Misik V, Stasko A, Vrabel I: **Redox intermediates of flavonoids and caffeic acid esters from propolis: an EPR spectroscopy and cyclic voltammetry study**. *Free Radical Biology & Medicine* 1995, 18:901-908.

- [48] Blasco AJ, Gonzalez MC, Escarpa A: **Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants.** *Anal. Chim. Acta* 2004, 511:71-81.
- [49] Blasco AJ, Rogerio MC, Gonzalez MC, Escarpa A: **"Electrochemical Index" as a screening method to determine "total polyphenolics" in foods: a proposal.** *Anal. Chim. Acta* 2005, 539:237-244.
- [50] Yang B, Kotani A, Arai K, Kusu F: **Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials.** *Analytical Sciences* 2001, 17:599-604.
- [51] Korbut O, Buckova M, Labuda J, Grundler P: **Voltammetric detection of antioxidative properties of flavonoids using electrically heated DNA modified carbon paste electrode.** *Sensors* 2003, 3:1-10.
- [52] Chevion S, Roberts MA, Chevion M: **The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity.** *Free Radical Biol. Med.* 2000, 28:860-870.
- [53] Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R: **Analysis and biological activities of anthocyanins.** *Phytochemistry* 2003, 64:923-933.
- [54] Clifford MN: **Anthocyanins- nature, occurrence and dietary burden.** *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000, 80:1063-1072.
- [55] Stintzing FC, Carle R: **Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food and in human nutrition.** *Trends in Food Science & Technology* 2004, 15:19-38.
- [56] Kinsella JE, Frankel E, German B, Kanner J: **Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods.** *Food Technology* 1993, 47:85-89.
- [57] Kowalczyk E, Krzesinski P, Kura M, Szmigiel B, Blaszczyk J: **Anthocyanins in medicine.** *Polish Journal of Pharmacology* 2003, 55:699-702.
- [58] Mazza G, Brouillard R: **Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products.** *Food Chemistry* 1987, 25:207-225.
- [59] Furtado P, Figueiredo P, Chaves das Neves H, Pina F: **Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins.** *J. Photochem. Photobiol. A* 1993, 75:113-118.
- [60] Brouillard R: *Chemical structure of anthocyanins* edn P. Markakis. New York: Academic Press; 1982.

- [61] Fossen T, Cabrita L, Andersen OM: **Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region.** *Food Chemistry* 1998, 63:435-440.
- [62] Torskangerpoll K, Andersen OM: **Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values.** *Food Chemistry* 2005, 89:427-440.
- [63] Stintzing FC, Stintzing AS, Carle R, Frei B, Wrolstad RE: **Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, 50:6172-6181.
- [64] Brouillard R, Chassaing S, Fougerousse A: **Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long?** *Phytochemistry* 2003, 64:1179-1186.
- [65] Revilla E, Ryan JM, Martín-Ortega G: **Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes.** *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46:4592-4597.
- [66] Simpson CF: **Practical High Performance Liquid Chromatography.** Edited by Simpson CF. London: Heyden & Son; 1978.
- [67] Schwedt G: *The Essential Guide to Analytical Chemistry* edn 2^a. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd.; 1997.
- [68] Prichard E, MacKay GM, Points J: **Trace analysis: a structured approach to obtaining reliable results.** Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 1996.
- [69] Sentell KB, Dorsey JG: **Retention mechanisms in Reverse-Phase Liquid Chromatography. Stationary-Phase bonding density and partitioning.** *Anal. Chem.* 1989, 61:930-934.
- [70] Neue UD: *HPLC Troubleshooting, Waters Corporation*; 1999.
- [71] Stulik K, Pacakova V: **Electrochemical detection techniques in high performance liquid chromatography.** *J. Electroanal. Chem.* 1981, 129:1-24.
- [72] LaCourse WR: **Pulsed Electrochemical Detection in high performance liquid chromatography.** 1997.
- [73] Bruggink C: **Backgrounds and possibilities for electrochemical detection in conjunction with anion exchange chromatography.** In *AVH Association - 7th Symposium; Reims*: 2000.
- [74] Justesen U, Knuthsen P: **Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes.** *Food Chemistry* 2001, 73:245-250.

- [75] Hertog MGL, Hollman PCH, Venema DP: **Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1992, 40:1591-1598.
- [76] Merken HM, Beecher GR: **Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones.** *Journal of Chromatography A* 2000, 897:177-184.
- [77] Revilla E, Ryan JM: **Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation.** *Journal of Chromatography; a* 2000, 881:461-469.
- [78] Mouly PP, Gaydou EM, Auffray A: **Simultaneous separation of flavanone glycosides and polymethoxylated flavones in citrus juices using liquid chromatography.** *J. Chromatogr.; a* 1998, 800:171-179.
- [79] Justesen U, Knuthsen P, Leth T: **Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection.** *Journal of Chromatograph; a* 1998, 799:101-110.
- [80] Merken HM, Beecher GR: **Measurement of food flavonoids by high-performance liquid Chromatography: a review.** *J. Agric. Food Chem.;* 2000, 48:577-599.
- [81] Escarpa A, González MC: **Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods.** *Anal. Chim. Acta* 2001, 427:119-127.
- [82] Kissinger PT: **Amperometric and coulometric detectors for High-Performance Liquid Chromatography.** *Anal. Chem.* 1977, 49:447A-456 A.
- [83] Guo C, CAO G, Sofic E, Prior RL: **High-performance liquid chromatography coupled with coulometric array detection of electroactive components in fruits and vegetables: relationship to oxygen radical absorbance capacity.** *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45:1787-1796.
- [84] Peyrat-Maillard MN, Bonnely S, Berset C: **Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection.** *Talanta* 2000, 51:709-716.
- [85] Sano M, Tabata M, Suzuki M, Degawa M, Miyase T, Maeda-Yamamoto M: **Simultaneous determination of twelve tea catechins by high-performance**

- liquid chromatography with electrochemical detection.** *Analyst* 2001, 126:816-820.
- [86] Ian Castro-Gamboa, Carmen L. Cardoso, Dulce H. S. Silva, Alberto J. Cavaleiro, Maysa Furlan, Vanderlan da S. Bolzani: **HPLC-EICD: Na Useful Toolfor the Pursuit of Novel Analytical Strategies for the Detection of Antioxidant Secondary Metabolites.** *J. Braz. Chem. Soc.*, 2003, vol. 14, No. 5, 771-776.
- [87] Przemysław Kozminski and Ana Maria Oliveira Brett: **Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection of Anthocyanins.** *Analytical Letters*, 2006, 39: 2687–2697.
- [88] Przemysław Kozminski and Ana Maria Oliveira Brett: **Anthocyanin Monitoring in Four Red Grape Skin Extract Varieties Using RP-HPLC-ED.** *Analytical Letters*, 2008, 41: 662-675.
- [89] M. Luisa Cervera, Miguel de la Guardia, Suparna Dutta, Arabinda Kumar Das: **An Overview of Green Analytical Techniques in the Spectrometric Analysis of Environmental and Biological Samples.** *Spectroscopy Letters*, 2009, 42: 284-295.
- [90] Alireza Ghassempour, Rouhollah Heydari, Zahra Talebpour, Ali Reza Fakhari, Ali Rassoulli, Noel Davies, Hassan Y. Aboul-Enein: **Study of New Extraction Methods for Separation of Anthocyanins from Red Grape Skins: Analysis by HPLC and LC-MS/MS.** *Journal of Liquid Chromatography Related Technologies*, 2008, 31: 2686-2703.
- [91] Kashif Ghafoor, Yong Hee Choi, Ju Yeong Jeon, In Hee Jo: **Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants and Anthocyanins from Grape (Vitis vinifera) Seeds.** *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57:4988-4994.
- [92] Lucie Nováková, Hana Vicková: **A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation.** *Analytica Chimica Acta*, 2009, 656:8-35.
- [93] Ivana Novak, Patricia Janeiro, Marijan Seruga, Ana Maria Oliveira-Brett: **Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection.** *Analytica Chimica Acta*, 2008, 630:107–115.
- [94] Petr Dobiáš, Petra Pavlíková, Martin Adam, Ales Eisner, Blanka Benová, Karel Ventura: **Comparison of pressurised fluid and ultrasonic extraction methods**

- for analysis of plant antioxidants and their antioxidant capacity.** Cent. Eur. J. Chem., 2010, 8(1):87-95.
- [95] Ni Hong, Varoujan A. Yaylayan, G. S. Vijaya Raghavan, J. R. Jocelyn Paré, Jacqueline M. R. Bélanger: **Microwave-assisted extraction of Phenolic compounds from grape seed.** Natural Product Letters, 2001, 15(3):197-204.
- [96] Erik V. Petersson, Jiayin Liu, Per J. R. Sjöberg, Rolf Danielsson, Charlotta Turner: **Pressurized Hot Water Extraction of anthocyanins from red onion: A study on extraction and degradation rates.** Analytical Chimica Acta, 2010, 663:27-32.
- [97] Swartz M, Krull IS: **Analytical method development and validation.** New York: Marcel Dekker, Inc.; 1997.