

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**APLICAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO E MÉTODOS
MULTIVARIADOS PARA AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS
FUNCIONAIS EM EXTRATOS DE ANTOCIANINAS**

Isadora Rebouças Nolasco de Oliveira

Doctor Scientiae

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

ISADORA REBOUÇAS NOLASCO DE OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO E MÉTODOS
MULTIVARIADOS PARA AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS
FUNCIONAIS EM EXTRATOS DE ANTOCIANINAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

O48a
2015 Oliveira, Isadora Rebouças Nolasco de, 1985-
Aplicação de espectroscopia de infravermelho e métodos multivariados para avaliação de características funcionais em extratos de antocianinas / Isadora Rebouças Nolasco de Oliveira. - Viçosa, MG, 2015.

xii, 117f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Paulo Cesar Stringheta.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Antocianinas - Análise. 2. Repolho roxo. 3. Uva.
4. Antioxidantes. 5. Fenóis. 6. Espectroscopia de infravermelhos.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

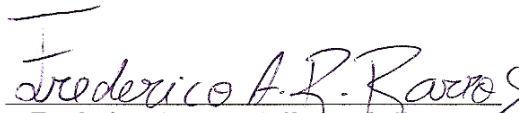
CDD 22. ed. 664.07

ISADORA REBOUÇAS NOLASCO DE OLIVEIRA

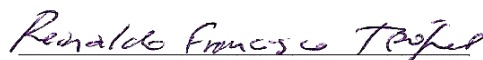
**APLICAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO E MÉTODOS
MULTIVARIADOS PARA AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS
FUNCIONAIS EM EXTRATOS DE ANTOCIANINAS**

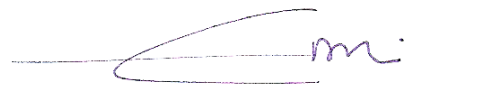
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

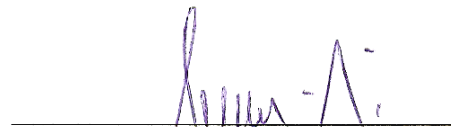
APROVADA: 03 de novembro de 2015.


Frederico Augusto Ribeiro de Barros


Adriana Corrêa Mendonça


Reinaldo Francisco Teófilo
(Coorientador)


Eduardo Basílio de Oliveira
(Coorientador)


Prof. Paulo César Stringheta
(Orientador)

A Deus, por estar sempre presente em todos os momentos de minha vida, guiando-me e iluminando meus caminhos.

OFEREÇO

Ao meu esposo Davi;
aos meus amados pais,
Elizabeth e Raimundo José;
Aos meus queridos irmãos Ramon,
Rodolfo, Pedro, Alice e Arthur.

DEDICO

*Não seja sábio aos seus próprios olhos;
tema o Senhor e evite o mal.*

Provérbios 3:7

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado e me conceder saúde e sabedoria.

Ao meu amado esposo, Davi, que em tudo me apoia.

A minha família: Pais e irmãos que apesar da distância, estão presente e torcem pelo meu sucesso. Não posso esquecer dos tios e tias, que foram muitas vezes pais e mães.

Ao meu orientador professor Dr. Paulo Cesar Stringheta, pela orientação e amizade, além dos conhecimentos, ensinamentos e histórias compartilhadas.

Aos meus coorientadores professor Dr. Reinaldo Francisco Teófilo e Dr. Eduardo Basílio de Oliveira, pela orientação, dedicação e pelo exemplo de competência dedicada ao trabalho.

Aos demais membros da banca, por terem aceitado participar desta banca de defesa de tese, enriquecendo ainda mais este trabalho.

A professora Nilda de Fátima Ferreira Soares e ao professor Márcio Henrique Pereira Barbosa, por ter cedido os equipamentos do infravermelho para realização deste trabalho.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, pelos ensinamentos e momentos compartilhados durante o curso de doutorado.

Aos colegas e bolsistas do Laboratório de Corantes Naturais e Compostos Bioativos (LacBio), pela convivência e pelo excelente ambiente de trabalho. Em especial a Mariza Paiva, minha estagiária.

A Jussara Roque, pela ajuda nas análises espectrofotométricas e no matlab.

Aos amigos de Rio Paranaíba pelos bons momentos e por compartilhar as lamentações e alegrias.

Aos colegas conquistados nas disciplinas e durante todo o período que estive em Viçosa, obrigada pela amizade e companheirismo.

A Estação Experimental de Viticultura Tropical da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) por ter cedido parte do material deste trabalho

A Universidade Federal de Viçosa, pelo apoio institucional e pelas oportunidades oferecidas.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta, para a realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

BIOGRAFIA

ISADORA REBOUÇAS NOLASCO DE OLIVEIRA, filha de Maria Elizabeth Rebouças Nolasco de Oliveira e Raimundo José de Oliveira, nasceu em 29 de julho de 1985, em Mossoró – RN.

Iniciou seus estudos no colégio Professor Eliseu Viana em 1992 na cidade de Mossoró – RN. Em 1995, transferiu-se para o Colégio Marista Cearense em Fortaleza – CE. No ano de 1997 continuou seus estudos no Colégio Diocesano Santa Luzia, Mossoró – RN, onde concluiu o ensino médio em 2002.

Em março de 2003, ingressou na Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza – CE, onde possui bolsa de monitoria, iniciação científica, entre outros trabalhos. Em dezembro de 2008 graduou-se em Engenharia de Alimentos pela UFC.

Em janeiro de 2009, obteve bolsa de apoio técnico e iniciou seus estudos no curso de pós-graduação como aluno não vinculado no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa – MG, onde em julho do mesmo ano tornou-se estudante regular, defendendo sua dissertação em julho 2011.

Em agosto de 2011 ingressou no Doutorado na mesma instituição. Em 2013 foi aprovada em concurso público para docente na Universidade Federal de Viçosa (UFV), campus de Rio Paranaíba – MG. Em novembro de 2015 defendeu sua tese de doutorado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	2
<i>Objetivos gerais.....</i>	2
<i>Objetivos específicos</i>	2
REFERENCIAL TEÓRICO	4
1 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	4
1.1 Moléculas bioativas com capacidade antioxidante	5
1.2 Métodos de avaliação “ <i>in vitro</i> ” da capacidade antioxidante.....	5
1.2.1 <i>ABTS</i>	6
1.2.2 <i>DPPH</i>	7
1.2.3 <i>FRAP</i>	9
1.3 Aplicação dos métodos de avaliação de capacidade antioxidante <i>in vitro</i> em materiais alimentares.....	9
2 MÉTODOS ESTATÍSTICOS MULTIVARIADOS.....	12
2.1 Delineamento fatorial Plackett-Burman	14
2.2 Delineamento de mistura.....	15
2.3 Calibração multivariada	19
2.3.1 <i>Aspectos práticos da regressão multivariada</i>	19
2.3.2 <i>Pré-tratamento dos dados</i>	20
2.3.3 <i>Regressão por Quadrados Mínimos Parciais (PLS)</i>	25
2.3.4 <i>Seleção de variáveis</i>	28
2.3.5 <i>Validação do modelo construído</i>	31
3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	32
3.1 Aplicação do infravermelho em alimentos.....	36
4 REFERÊNCIAS.....	38

ARTIGO I

AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS INTERFERENTES NOS MÉTODOS *in vitro* DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE ANTOCIANINAS EM EXTRATOS DE ANTOCIANINAS

RESUMO.....	46
1 INTRODUÇÃO	47
2 MATERIAL E MÉTODOS	48
2.1 Extração, purificação e quantificação de antocianinas.....	48
2.2 Efeito de potenciais interferentes sobre a capacidade antioxidante <i>in vitro</i> do extrato de antocianinas purificado.....	50
2.2.1 <i>Efeito dos ácidos gálico e ascórbico</i>	50
2.2.2 <i>Efeito de outros antioxidantes, açúcares redutores, ácidos orgânicos, minerais e aminoácidos</i>	51
2.3 Ensaio <i>in vitro</i> de capacidade antioxidante	52
2.3.1 <i>DPPH</i>	52
2.3.2 <i>ABTS</i>	53
2.3.3 <i>FRAP</i>	53
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54

3.1	Efeito dos ácidos gálico e ascórbico sobre a capacidade antioxidante <i>in vitro</i> do extrato de antocianinas	54
3.2	Efeito de açúcares redutores, ácidos orgânicos, minerais e aminoácidos sobre a capacidade antioxidante <i>in vitro</i> do extrato antociânico	58
4	CONCLUSÃO	60
5	REFERÊNCIAS	61

ARTIGO II

DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE ANTOCIANINAS, POLIFENÓIS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE REPOLHO ROXO (*Brassica oleracea*) POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

RESUMO	65
1 INTRODUÇÃO	66
2 MATERIAL E MÉTODOS	67
2.1 Obtenção do extrato e análises de referência	67
2.1.1 <i>Antocianinas totais</i>	68
2.1.2 <i>Antocianinas monoméricas</i>	68
2.1.3 <i>Polifenóis totais</i>	69
2.1.4 <i>Capacidade antioxidante</i>	69
2.2 Obtenção dos espectros infravermelho e tratamento quimiométrico dos dados. 70	
2.2.1 <i>Calibração multivariada</i>	70
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4 CONCLUSÃO	90
5 REFERÊNCIAS	90

ARTIGO III

DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE ANTOCIANINAS, POLIFENÓIS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM EXTRATOS DE UVA VIOLETA (*Vitis labrusca*, var *BRS violeta*) POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO E MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

RESUMO	94
1 INTRODUÇÃO	95
2 MATERIAL E MÉTODOS	96
2.1 Obtenção do extrato e análises de referência	96
2.1.1 <i>Antocianinas totais</i>	97
2.1.2 <i>Polifenóis totais</i>	97
2.1.3 <i>Capacidade antioxidante</i>	98
2.2 Obtenção dos espectros e tratamento quimiométrico dos dados.....	98
2.2.1 <i>Calibração multivariada</i>	99
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	100
4 CONCLUSÃO	108
5 REFERÊNCIAS	108
CONCLUSÃO GERAL	117

LISTA DE ABREVIÇÕES

%E	Erro relativo médio
ABTS	2,20-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)
ABTS _{TEAC}	Capacidade antioxidante pelo método ABTS expressa em TEAC
Alis	Algoritmo de alisamento
AM	Antocianinas monoméricas
ANOVA	Análise de Variância
AT	Antocianinas totais
ATR	Refletância total atenuada
Base	Algoritmo de correção da linha de base
CA	Capacidade antioxidante
CLS	Regressão por quadrados mínimos clássico
D1	Algoritmo de 1ª derivada
D2	Algoritmo de 2ª derivada
DPPH	2,2-difenil-1-picrylhydrazyl
DPPH _{%Seq}	Capacidade antioxidante pelo método DPPH expressa em % da atividade sequestrante
DPPH _{EC50}	Capacidade antioxidante pelo método DPPH expressa em EC50
DPPH _{TEAC}	Capacidade antioxidante pelo método DPPH expressa em TEAC
EC50	Redução de 50% do radical ou tempo de meia vida
FRAP	Poder antioxidante de redução do ferro
FRAP _{EC50}	Capacidade antioxidante pelo método FRAP expressa em EC50
FRAP _{TEAC}	Capacidade antioxidante pelo método FRAP expressa em TEAC
MID	Infravermelho médio
MLR	Regressão linear múltipla
MSCD	Planejamento simplex-centroide aumentado
NIR	Infravermelho próximo
<i>nVars</i>	Número de variáveis selecionadas pelo OPS
<i>nVL</i>	Número de variáveis latentes
OPS	Seleção dos preditores ordenados
out	<i>Outliers</i>
PCA	Análise de Componentes Principais
PCR	Regressão por componentes principais
PLS	Regressão por quadrados mínimos parciais
PLS-1	Regressão por quadrados mínimos parciais, modelando uma análise
PLS-2	Regressão por quadrados mínimos parciais, modelando várias análises simultaneamente
PLS-OPS	Regressão por quadrados mínimos parciais, com seleção de variáveis
POLI	Polifenóis totais
r	Coefficiente de correlação
r _c	Coefficiente de correlação da calibração
RMSE	Raiz Quadrática Média do Erro
RMSECV	Raiz Quadrática Média do Erro de Validação Cruzada
RMSEP	Raiz Quadrática Média do Erro de Predição
r _p	Coefficiente de correlação da previsão
RPD	Relação de Desempenho do Desvio
r _v	Coefficiente de correlação da validação cruzada
SCD	Planejamento simplex centroide
SLD	Planejamento simplex básico
TEAC	Capacidade equivalente ao trolox

RESUMO

OLIVEIRA, Isadora Rebouças Nolasco de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2015. **Aplicação de espectroscopia de infravermelho e métodos multivariados para avaliação de características funcionais em extratos de antocianinas.** Orientador: Paulo Cesar Stringheta. Coorientadores: Reinaldo Francisco Teófilo e Eduardo Basílio de Oliveira.

A avaliação dos efeitos de açúcares, metais, ácidos e outros antioxidantes sobre a estimativa da capacidade antioxidante *in vitro* de antocianinas por diferentes técnicas e o desenvolvimento de um método rápido para a determinação de antocianinas, polifenóis totais e capacidade antioxidante em extratos de repolho roxo (*Brassica oleraceae*) e uva violeta (*Vitis labrusca*, var *BRS Violeta*) foram objetivos deste trabalho. Foram avaliados três métodos para estimativa da capacidade antioxidante e suas diferentes formas de expressar o resultado: $ABTS_{TEAC}$ (capacidade equivalente ao trolox, pelo ABTS (2,20-azino-bis (3-etilbenzotiazolona))), $DPPH_{TEAC}$ (capacidade equivalente ao trolox, pelo DPPH (2,2-difenil-1-picrylhidrazil)), $DPPH_{EC50}$ (redução de 50% do radical DPPH), $DPPH_{\%Seq}$ (porcentagem da antioxidante sequestrante, pelo DPPH), $FRAP_{TEAC}$ (capacidade equivalente ao trolox, pelo FRAP (capacidade redutora do ferro) e $FRAP_{EC50}$ (redução de 50% do radical, pela capacidade redutora do ferro). Neste estudo foram avaliados os efeitos de frutose, glicose, ácido tartárico e málico, magnésio, potássio, cisteína, triptofano, tirosina, ácido ascórbico e gálico sobre a capacidade antioxidante de antocianinas. O segundo estudo foi desenvolvido buscando a consolidação de um método rápido das características funcionais (antocianinas, polifenóis e capacidade antioxidante) dos extratos de repolho roxo e uva violeta. Foi empregado espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR) e infravermelho médio (MID) aliados a regressão por quadrados mínimos parciais (PLS) e ao método de seleção dos preditores ordenados (OPS). Para isto, foi utilizado extratos aquosos de repolho roxo e uva violeta em diferentes concentrações (5 – 100 %). Os espectros NIR foram investigados na faixa 10000 a 4000 cm^{-1} empregando absorvância e o MID na faixa 4000 a 650 cm^{-1} empregando refletância total atenuada (ATR). Os resultados do primeiro estudo indicaram que a capacidade antioxidante estimadas por $DPPH_{EC50}$ e $FRAP_{EC50}$ foram os que apresentaram mais interferência nos resultados quando aplicados em meio contendo ácido tartárico e ácido ascórbico. O método mais coerente foi o $ABTS_{TEAC}$, pois apresentou interferência apenas do ácido ascórbico. O ácido ascórbico mostrou ser um poderoso interferente em todos os métodos, devendo ser removido do meio antes de se

executar quantificações *in vitro* de capacidade antioxidante de antocianinas. No segundo estudo, a modelagem de predição rápida em extrato de repolho roxo, demonstrou que os modelos PLS-OPS apresentaram os melhores resultados na predição de todas as propriedades, com coeficientes de correlação (r) > 0,99, relação de desempenho do desvio (RPD) > 5,80 e erro médio relativo (%E) < 10%. Os espectros NIR forneceram os melhores modelos para antocianinas monoméricas e capacidade antioxidante, pelo ABTS e DPPH, com erro médio quadrático de previsão (RMSEP) de 32,23, 0,21 e 0,13, respectivamente; enquanto os espectros MID foram mais preditivos para antocianinas totais e polifenóis, apresentando RMSEP de 14,31 e 34,62, respectivamente. Por outro lado, apesar de possuírem valores de correlação (r_v e r_p) e RDP elevados, os modelos PLS para uva violeta não foram satisfatórios para determinar antocianinas totais e polifenóis, pois os valores de RMSEP e %E apresentam-se inadequados, mostrando que os modelos não apresentam uma boa previsão. No extrato de uva violeta, ao trabalhar com valores de DPPH entre 1,3 – 15,97 $\mu\text{M trolox}\cdot\text{mL}^{-1}$, o modelo do espectro MID mostrou-se adequado para esta propriedade, apresentando %E = 5,24%, RMSEP = 0,63 e correlação elevada ($r_p > 0,99$). Para todas as propriedades avaliadas no repolho roxo e para a capacidade antioxidante (DPPH_{TEAC}) no extrato de uva violeta, o método de predição rápida mostrou-se simples e exato para determinar tais características funcionais destes extratos, cuja metodologia poderá ser utilizada em laboratórios de pesquisas, desenvolvimento e de controle de qualidade nas indústrias de alimentos, em universidade e centros de pesquisas.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Isadora Rebouças Nolasco de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2015. **Application of infrared spectroscopy and multivariate methods for evaluating functional characteristics of anthocyanin extracts.** Adviser: Paulo Cesar Stringheta. Co-advisers: Reinaldo Francisco Teófilo and Eduardo Basílio de Oliveira.

The assessment of the effects of sugars, metals, acids and other antioxidants on the *in vitro* estimated antioxidant capacity of anthocyanins by different techniques and the development of a rapid method for the determination of anthocyanin, polyphenol and antioxidant capacity in red cabbage extracts (*Brassica oleracea*) and purple grape (*Vitis labrusca*, var BRS Violet) were objectives of this work. It was evaluated three methods to estimate the antioxidant capacity and its different ways of expressing result: ABTS_{TEAC} (equivalent capacity to trolox by ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline))), DPPH_{TEAC} (equivalent capacity to trolox, by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)), DPPH_{EC50} (50% reduction of the radical DPPH), DPPH_{%Seq} (percentage of antioxidant scavenger by DPPH) FRAP_{TEAC} (equivalent to the capacity trolox by FRAP (Ferric Reducing Ability) and FRAP_{EC50} (50% reduction of the radical by Ferric Reducing Ability). In this study it was assessed the effects of fructose, glucose, tartaric and malic acid, magnesium, potassium, cysteine, tryptophan, tyrosine, ascorbic and gallic acid on the antioxidant capacity of anthocyanins. In the second study it was developed a rapid method for functional characteristics (anthocyanins, polyphenols and antioxidant capacity) of red cabbage extract and purple grape. It was used infrared near (NIR) and mid-infrared (MID) spectroscopy allied to partial least squares regression (PLS) and the ordered predictors selection method (OPS). Therefore, it was used aqueous extracts of red cabbage and purple grape at different concentrations (5 - 100%). NIR spectrum was investigated in the range from 10000 to 4000 cm⁻¹ using absorbance whilst MID spectrum was investigated in the range from 4000 to 650 cm⁻¹ using attenuated total reflectance (ATR). The results of the first study showed that the antioxidant capacity estimated by DPPH_{EC50} and FRAP_{EC50} were those with more interference in the results when applied in medium containing tartaric and ascorbic acid. On the other hand, ABTS_{TEAC} method presented more consistency, once it had interference only with ascorbic acid. Ascorbic acid has shown to be a powerful interferer in all methods, so that it should be removed from the medium before carrying out the anthocyanins *in vitro* antioxidant capacity quantification. In the second study, rapid prediction modeling for red cabbage extract demonstrated that the PLS-OPS models showed the best results on all properties

predicting, with correlation coefficients (r) > 0.99, ratio performance deviation (RPD) > 5.80 and mean relative error (% E) < 10%. NIR spectra have provided the best models for monomeric anthocyanin and antioxidant capacity by ABTS and DPPH methods, with root mean squared error of prediction (RMSEP) of 32.23, 0.21 and 0.13, respectively; while MID spectra were more predictive for total anthocyanins and polyphenols, showing RMSEP 14.31 and 34.62, respectively. On the other hand, despite having had high correlation (r_v and r_p) and RDP, PLS models for violet grapes were not satisfactory to determine total anthocyanins and polyphenols, once they presented inadequate RMSEP and %E. Thus these models did not predictive. For the DPPH range concentrations from 1.3 to 15.97 $\mu\text{M trolox}\cdot\text{mL}^{-1}$, the MID spectrum model could predict well this property for violet grape extract, with %E = 5.24, RMSEP = 0.63 and high correlation ($r_p > 0.99$). For all properties evaluated in the red cabbage and for the antioxidant capacity (DPPH_{TEAC}) in violet grape extract, rapid prediction method was simple and accurate to determine such functional characteristics of these extracts, whose methodology may be used in research laboratories, development and quality control in food industry, university and research centers.

INTRODUÇÃO GERAL

Devido a grande preocupação com a saúde, o apelo para o consumo de compostos que reduzem os efeitos deletérios dos radicais livres está em ascensão, e com isto cresce também o número de trabalhos que visam determinar a capacidade antioxidante de diversas matrizes alimentares. No entanto, não há consenso sobre a adequação e a acurácia dos diferentes métodos de avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante antirradicalar de biomoléculas, tais como polifenóis e outros metabólitos secundários vegetais.

O desenvolvimento de novos métodos para avaliação da capacidade antioxidante (CA) tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. As técnicas utilizadas envolvem ensaios químicos com substratos lipídicos ou hidrófilos, ensaios enzimáticos ou ensaios elétricos. Cada um dos métodos de determinação de capacidade antioxidante apresenta um princípio de ação que engloba uma determinada classe de agentes antioxidantes. Por isso a estrutura molecular do antioxidante em estudo deve ser previamente conhecida para se então escolher um método de avaliação que seja compatível. A não especificidade é outro inconveniente pois um método pode abranger mais de um grupo de antioxidantes, bem como sofre influências de outros compostos da amostra.

Além disso, as condições experimentais não conseguem reproduzir a complexidade das reações que ocorrem no organismo. Sendo assim, a determinação da capacidade antioxidante *in vitro* é apenas uma estimativa do que ocorreria *in vivo*. É recomendável utilizar mais de um método *in vitro* para avaliar a ação antioxidante das amostras, no entanto, não existe um consenso sobre qual seria a combinação mais adequada para realizar esta avaliação. Isto faz com que haja uma grande disparidade nos resultados de estudos que empregam diferentes técnicas, dificultando a comparação.

É importante considerar ainda que os métodos tradicionais de determinação da capacidade antioxidante e da composição bioativa são morosos, destrutivos e consomem grande quantidade de reagentes químicos, que na maioria das vezes são de alto custo. Estes métodos não estão em acordo com a necessidade de se obter respostas em um menor tempo e com menor custo. Neste contexto, há a necessidade de se desenvolver metodologias analíticas rápidas, precisas, não destrutivas e que respeitem o meio ambiente.

A espectroscopia no infravermelho somada aos tratamentos de dados usando métodos quimiométricos vêm sendo utilizados para realizar previsões de propriedades químicas e físicas de alimentos, fármacos, produtos de origem agrícola e outras matrizes. O aumento da utilização da técnica de infravermelho deve-se à rapidez, simplicidade, ausência ou não necessidade de tratamentos prévios da amostra, além do baixo custo das análises. O ajuste de um modelo gerado por espectros do infravermelho é justificável devido à praticidade de se obter, através de um único espectro, informações referentes às várias análises para o qual este foi modelado.

Diante disto, é importante o estudo dos métodos de estimativa da capacidade antioxidante de antocianinas e o de desenvolvimento de um método rápido, de baixo custo, não destrutivo e ambientalmente seguro para prever a capacidade antioxidante e composição funcional de extratos de antocianinas, uma vez que estas características são fundamentais para mostrar a importância destes compostos fenólicos como um corante natural e como um bioativo com possíveis alegações de funcionalidades quando adicionadas em alimentos processados.

OBJETIVOS

Objetivos gerais

— Investigar, dentre os métodos comumente utilizados de determinação da capacidade antioxidante *in vitro* (ABTS, DPPH e FRAP), qual o método e forma de expressão de resultado é mais coerente para amostras fontes de antocianinas.

— Desenvolvimento de método de análise rápida para prever a capacidade antioxidante, quantificação de antocianinas e fenólicos totais usando espectroscopia do infravermelho próximo (NIR) e médio (MID), aplicando métodos quimiométricos.

Objetivos específicos

— Verificar a variabilidade de resultados e o efeito de interferentes (frutose, glicose, ácido tartárico e málico, magnésio, potássio, cisteína, triptofano, tirosina, ácido ascórbico e gálico) sobre métodos clássicos de avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante (ABTS, DPPH e FRAP).

— Estudar as diferentes formas de expressão dos resultados dos métodos clássicos de avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante (ABTS, DPPH e FRAP).

- Capacidade equivalente ao trolox (TEAC)

- Porcentagem sequestrante (%seq)
- Redução de 50% do radical: (EC50)
- Definir o método e a forma de expressão do resultado da capacidade antioxidante é mais adequado para amostras de antocianinas.
- Determinar a concentração de antocianinas totais, compostos fenólicos e capacidade antioxidante dos extratos das potenciais fontes comerciais de antocianinas (uva e repolho roxo).
- Construir modelos de calibração multivariada usando métodos quimiométricos relacionando os espectros NIR ou MID às propriedades químicas (antocianinas totais, compostos fenólicos e capacidade antioxidante).

REFERENCIAL TEÓRICO

1 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

O termo radical livre é frequentemente usado para designar qualquer espécie química contendo um ou mais elétrons desemparelhados na camada de valência, o que a torna altamente reativa, capaz de sofrer redução com qualquer composto que esteja próximo e, desse modo, é um oxidante (Halliwell *et al.*, 1995).

Antioxidantes são compostos que previnem a formação ou evitam a propagação de radicais livres, interrompendo a cadeia de reações, pois reagem com tais espécies nas etapas iniciais formando intermediários estáveis (Valenzuela, Nieto e Uauy, 1993).

Muitas reações biológicas naturais e indispensáveis são de oxidação (produção de energia, metabolismos de glicose e ácidos graxos, fosforilação oxidativa, etc.) (Alves *et al.*, 2010), porém a oxidação excessiva de compostos pode gerar danos às células. Isso pode acarretar problemas tecnológicos ou biológicos, dependendo do contexto. Assim, existem situações em que substâncias com capacidade antioxidante podem ser utilizadas para desacelerar ou inibir reações de oxidação indesejáveis.

A capacidade antioxidante de um composto refere-se à sua capacidade de inibir a degradação oxidativa. Pode ser avaliada medindo-se o potencial antioxidante, que é influenciado pelas propriedades químicas dos constituintes e, ainda, pela atividade biológica (Santos *et al.*, 2007).

A definição mais ampla de antioxidante é “substâncias que, presentes em concentrações baixas comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato” (Sies, 1993). Existe também a definição de antioxidante alimentar, de acordo com a US NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (2000), “como sendo toda substância na dieta capaz de reduzir significativamente os efeitos adversos produzidos por espécies reativas, como aquelas de oxigênio e nitrogênio, e que possuem função normal no organismo”. Esses efeitos adversos podem ser tanto tecnológicos (referentes à qualidade e conservação dos produtos), quanto biológicos (efeito fisiológico indesejável ao usuário do produto).

O desempenho dos antioxidantes *in vivo* depende principalmente dos tipos de radicais livres formados, de onde e como são gerados e das doses ideais para a proteção. Assim, é possível que um antioxidante atue de forma eficaz em determinado sistema, mas não o seja ou mesmo potencialize efeitos da oxidação em outros sistemas ou tecidos

(Halliwell *et al.*, 1995). Com isso se faz importante conhecer a ação específica dos antioxidantes, bem como mecanismos de ação e a sua relação com a estrutura química, em um meio com características físico-químicas bem definidas (pH, potencial redox, força iônica, etc.).

1.1 Moléculas bioativas com capacidade antioxidante

O organismo humano é provido de um sistema de defesa efetivo, capaz de produzir substâncias (antioxidantes endógenos), que inibem a formação e propagação dos radicais livres. Estas substâncias antioxidantes incluem várias enzimas (superóxido dismutase, catalase, glutathiona-peroxidase, etc.) e outras moléculas de alto e baixo peso molecular (glutathiona, ácido úrico, etc.) (Kaur e Kapoor, 2001). A ação dos antioxidantes endógenos, pode ser potencializada com os consumidos na dieta (antioxidantes exógenos), que incluem ácido ascórbico (vitamina C), vitamina E (tocoferóis), vitamina A, carotenoides e compostos fenólicos. Entre os antioxidantes presentes em alimentos de origem vegetal, os mais ativos e abundantes são os compostos fenólicos, tais como os ácidos fenólicos e flavonoides (Soares, 2002).

A ingestão regular de compostos fenólicos em geral e de antocianinas, em específico, correlaciona-se com uma redução da probabilidade de incidência de doenças cardiovasculares (Formica e Regelson, 1995; Kruger *et al.*, 2014; Yamagata, Tagami e Yamori, 2015). Os compostos fenólicos inibem processos de inflamação vascular que contribuem para o aparecimento de doenças cardiovasculares. Diversos flavonoides atuam inibindo enzimas catalisadoras de substâncias que desencadeiam reações inflamatórias, a exemplo das enzimas ciclooxigenases e lipoxigenases (Lajolo, 2002).

1.2 Métodos de avaliação “*in vitro*” da capacidade antioxidante

Existem diversos métodos para avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, envolvendo desde ensaios químicos simples com substratos lipídicos a ensaios mais complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais (Sanchez-Moreno, 2002). Devido aos diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, dificilmente existirá um método laboratorial simples e universal pelo qual a capacidade antioxidante possa ser medida com exatidão e precisão. Para se ter uma avaliação mais exata da capacidade antioxidante de uma determinada substância, é necessário saber quais tipos de radicais são gerados, como e onde são gerados e a extensão do dano causado (Alves *et al.*, 2010).

Existem diversos métodos para avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante total propostos na literatura, porém, alguns são mais apropriados que outros, em casos específicos, dependendo da natureza dos compostos presentes na constituição de cada amostra. Deste modo, existem métodos para amostras ricas em compostos hidrofílicos e métodos para amostras ricas em compostos lipofílicos. Uma das maiores dificuldades na comparação de resultados é a falta de padronização dos métodos usados, bem como na apresentação e/ou expressão dos resultados.

Além da especificidade que os métodos para determinação da capacidade apresentam, existe ainda a possibilidade de estarem sujeitos a interferências. Por isso, atualmente, preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas, já que nenhum ensaio isoladamente irá refletir de forma absoluta e objetiva a “capacidade antioxidante total” de uma amostra (Huang, Ou e Prior, 2005; Prior, Wu e Schaich, 2005).

A busca por testes mais rápidos e eficientes tem gerado novas variantes de métodos tradicionais para avaliar a atividade de antioxidantes naturais, pelo uso de diferentes sistemas geradores de radicais livres (Alves *et al.*, 2010).

Dentre os métodos mais utilizados para determinação da capacidade antioxidante em alimentos estão: 2,2-difenil-1-picril hidrazina (DPPH), Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP), Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio (ORAC), Sistema β -caroteno/ácido linoléico e o 2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato (ABTS). Os métodos que serão empregados neste trabalho estão descritos nas seções seguintes.

1.2.1 ABTS

O ensaio da capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC) foi relatado primeiramente por Miller *et al.*, (1993), em que o radical ABTS^{•+} foi gerado através da reação entre mioglobina e o ABTS, sendo a amostra em teste adicionada ao meio antes da geração total do radical. Este procedimento poderia levar a uma subavaliação, pois alguns antioxidantes presentes na amostra teste (os que reagem mais rapidamente) também poderiam contribuir para a redução do radical (Re *et al.*, 1999). Posteriormente este método foi melhorado de modo que o radical fosse formado por reação química com persulfato de potássio antes da adição da amostra testada (Re *et al.*, 1999). O ABTS^{•+} pode ser gerado após uma reação eletroquímica, enzimática ou química, podendo ser com persulfato de potássio (Figura 1) ou dióxido de manganês (Kuskoski *et al.*, 2005).

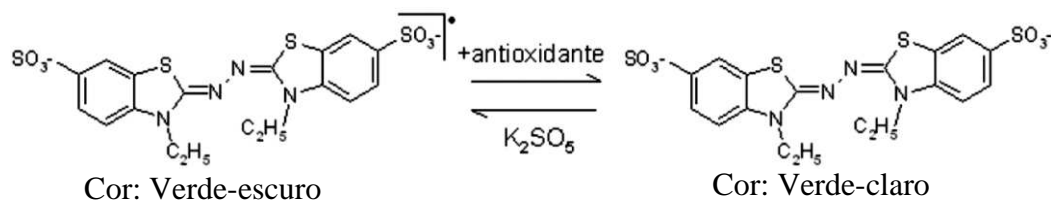
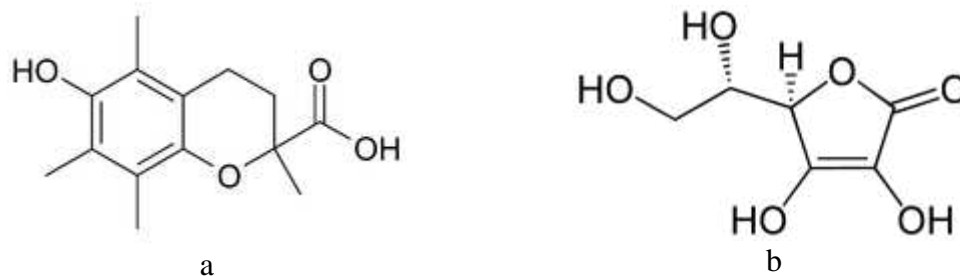


Figura 1 – Estabilização do radical $ABTS^{\bullet+}$ por um antioxidante e sua formação pela reação com persulfato de potássio.

FONTE: (Rufino et al., 2007a)

O radical catiônico $ABTS^{\bullet+}$ (de cor esverdeada) quando em um meio contendo antioxidantes (Figura 1), sofre decréscimo na absorvância, o que permite avaliar a capacidade antioxidante (Pérez-Jiménez e Saura-Calixto, 2006).

O ensaio avalia fotometricamente o decréscimo da absorvância do cátion $ABTS^{\bullet+}$ ao ser capturado pelas substâncias antioxidantes presentes na amostra, comparando com a de um antioxidante sintético padrão ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetra metil cromano (Trolox), um análogo hidrossolúvel da vitamina E. A atividade dos compostos é expressa em valores de TEAC, que é definido como a concentração equivalente de trolox por grama de amostra. Outros antioxidantes também podem ser utilizados como padrão em substituição ao Trolox (Figura 2a), a exemplo da vitamina C (Figura 2b), sendo o resultado expresso como VCEAC (Kuskoski *et al.*, 2005).



a
TROLOX (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetra metil cromano)

b
Ácido ascórbico (Vitamina C)

Figura 2 – Antioxidantes utilizados como padrão pelo método ABTS.

Com o ABTS pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica. O radical $ABTS^{\bullet+}$ apresenta picos de absorvância a 414, 654, 734 e 815 nm, em meio alcoólico, representando vantagem ao se utilizar o comprimento de onda que apresenta menor interferência. O pico máximo e o comumente utilizado no monitoramento da absorvância é o 734 nm (Re *et al.*, 1999).

1.2.2 DPPH

De acordo com Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), o método do radical lipossolúvel $DPPH^{\bullet}$, é baseado na inativação ou estabilização desse radical por

antioxidantes, o qual produz um decréscimo da absorvância a 515 nm. Este método foi modificado por Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-calixto, (1998) ao medir os parâmetros cinéticos que envolve a reação do DPPH• com os antioxidantes presentes na amostra.

A reação do DPPH com um antioxidante (AH) ou um radical livre (R•) (Figura 3), promove um decaimento de absorvância, e o DPPH é reduzido, modificando a coloração inicial violeta-escuro para violeta-claro, sendo possível monitorá-la pela leitura da absorvância a 515 nm. A partir da redução da absorvância, determina-se a capacidade antioxidante.

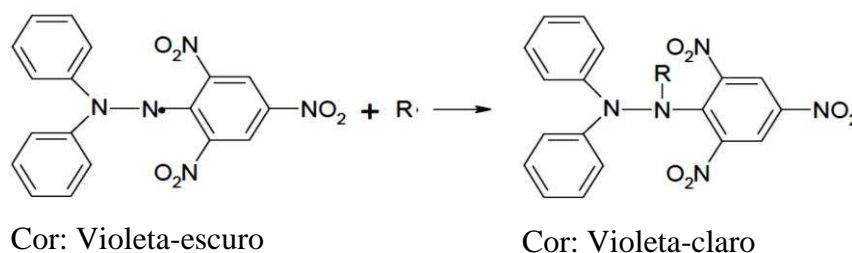


Figura 3 – Estabilização do radical livre DPPH.

FONTE: (Rufino *et al.*, 2007b)

Na literatura são relatadas diferentes formas de expressar o resultado. A porcentagem de capacidade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional, em um determinado tempo é obtida pela Equação 1 (Brand-Williams, Cuvelier e Berset, 1995; Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-calixto, 1998).

$$\% \text{sequestrante} = \left[1 - \frac{(DPPH^{\bullet})^f}{(DPPH^{\bullet})^0} \right] \times 100 \quad \text{Eq.:1}$$

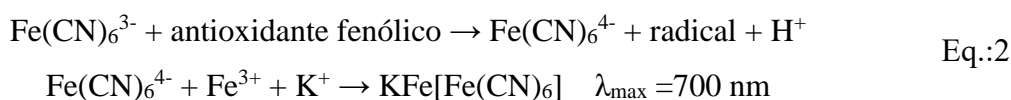
em que: (DPPH•)⁰: Absorvância inicial; (DPPH•)^f: Absorvância final

Outra forma de expressar o resultado consiste em realizar diferentes diluições do composto em teste, obter um curva de decaimento da absorvância e calcular pela equação linear o valor de EC50 (concentração em que ocorre redução de 50% da absorvância inicial) (Brand-Williams, Cuvelier e Berset, 1995; Chen, Bertin e Frolidi, 2013). Os resultados também podem ser expressos em TEAC, de modo semelhante ao que foi relatado para o radical ABTS^{•+}. O resultado em TEAC expressa a concentração do composto teste que equivale ao Trolox (mM·g de amostra⁻¹), podendo ser empregado outro antioxidante como padrão, a exemplo da vitamina C, expressando seu resultado como VCEAC (Kim *et al.*, 2002; Kuskoski *et al.*, 2005).

1.2.3 FRAP

O ensaio de FRAP original usa tripyridyltriazine (TPTZ) como o ligante do ferro, enquanto ligantes alternativos também têm sido empregados. Recentemente, ferricianeto de potássio tem sido o reagente férrico mais popular usado em ensaios de FRAP (Shahidi e Zhong, 2015).

Este método baseia-se na redução do ferricianeto a ferrocianeto por compostos doadores de elétrons contidos na amostra (Oyaizu, 1986). A presença de agentes redutores provoca a redução do complexo Fe^{3+} /ferricianeto ($(\text{Fe}^{3+})_4 [\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6]^{3-}$) a uma forma ferrosa (Fe^{2+}), após a adição de íons Fe^{3+} (FeCl_3). A formação de azul “Perl’s Prussian” ($\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), medida a 700 nm, é usada para monitorar a concentração de Fe^{2+} (Apak *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2007). As reações envolvidas são:



Na literatura há diferentes formas de expressão do resultado: redução baseada em um antioxidante padrão (Santos *et al.*, 2007) ou simplesmente a absorbância final da amostra (Oliveira *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011; Sultana, Anwar e Iqbal, 2008). Pode-se usar diferentes antioxidantes como padrão, a exemplo do ascórbico, BHT, BHA, ácido gálico (Huber *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2007). Quando se expressa o resultado em absorbância, as conclusões são levantadas a partir de que uma maior absorbância da mistura de reação indica maior poder redutor da amostra (Silva *et al.*, 2011).

1.3 Aplicação dos métodos de avaliação de capacidade antioxidante *in vitro* em materiais alimentares

Diversos métodos para determinar a capacidade antioxidante foram aplicados de forma extensiva na avaliação de alimentos, de modo que os termos que os caracterizam (TEAC, DPPH, ORAC, entre outros) são termos comuns em diversas publicações científicas e *sites* da internet (Schaich, Tian e Xie, 2015). Os resultados relatados em diversos trabalhos são utilizados para indicar os alimentos com maior capacidade antioxidante, que são mais indicados ao consumo por trazerem benefícios a saúde.

Uma gama de trabalhos pode ser encontrada e seus resultados cuidadosamente comparados (Tabela 1). Ao se comparar os dados é necessário observar o solvente de extração, os compostos bioativos presentes e os métodos utilizados para medir a capacidade antioxidante, bem como a expressão dos resultados.

Tabela 1 – Aplicação de diversos de métodos de avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante

Material	Extração	Polifenóis	Capacidade antioxidante	Referência
Diversas amostras de origem vegetal	Acetona: água: ácido acético (70:28:2)	Folin–Ciocalteu: 0 – 582 ± 26 mg CAE·100g ⁻¹ (b.u)	DPPH: 0 – 683 ± 40 ORAC: 160±32 – 2118 ± 96 Resultados expressos: μMTrolox·100g ⁻¹ (b.u)	(Kevers <i>et al.</i> , 2007)
Berinjela (<i>Solanum melongena</i> var. <i>esculentum</i>)	Etanol:água:HCl (70:30:1) vs sol. ácidas	Folin–Ciocalteu: 163,13 ± 12,62 – 191,94 ±14,28 μgAGE·ml ⁻¹	DPPH: 2,06 – 38,92 [EC50] (??/μL ou μg) Unidade não informada claramente	(Todaro <i>et al.</i> , 2009)
Suco, chá e vinho (diferentes fontes)	Diluição em metanol e centrifugação	Folin–Ciocalteu: 200 – 1200 mg AGE·100ml ⁻¹	DPPH: 10 – 800 ABTS: 300 – 1900 ORAC: 400 – 1250 Resultados expressos: μmol TEAC·100ml ⁻¹	(Tabart <i>et al.</i> , 2009)
<i>Eugenia brasiliensis</i> , <i>E. beaurepaireana</i> e <i>E. umbeliflora</i>	Etanol 70 %	Folin–Ciocalteu: 105,8 ± 2,6 – 225,4 ± 2,6 mg AGE·g ⁻¹	DPPH: 12,61 - 52,20 g·mL ⁻¹ [EC50] FRAP: 124,3 ± 1,1 – 625,7 ± 1,2 mg AA·g ⁻¹	(Magina <i>et al.</i> , 2010)
Gergelim (<i>Sesamum indicum</i> L)	Metanol: água (60:40) v/v	Folin–Ciocalteu: Gergelim creme: 147,5 ± 31,7 gAGE·100g ⁻¹ Gergelim preto: 261,9 ± 7,5 gAGE·100g ⁻¹	DPPH Gergelim creme: 27,45±1,76 % Gergelim preto: 52,98±7,53 % FRAP [valores de ABS] Gergelim creme: 0,73±0,03 Gergelim preto: 1,05±0,05 Concentração das amostras não informadas	(Silva <i>et al.</i> , 2011)
Mamão (<i>Carica papaya</i> L. var. Formosa) Manga (<i>Mangifera indica</i> L. var. Tommy Atkins) Goiaba vermelha (<i>Psidium guajava</i> var. Paluma)	Metanol: água (60:40) v/v	Folin–Ciocalteu: Mamão: 88,1 mgAGE·100g ⁻¹ Manga: 59,8 mgAGE·100g ⁻¹ Goiaba: 159,8 mgAGE·100g ⁻¹	DPPH Mamão: 23,5% / Manga: 23,1% / Goiaba: 49,1% FRAP [valores de ABS] Mamão: 0,21 / Manga: 0,12 / Goiaba: 0,41 Concentração das amostras não informadas	(Oliveira <i>et al.</i> , 2011)

Continua...

Material	Extração	Polifenóis	Capacidade antioxidante	Referência
Resíduos da Manga ubá (casca e caroço)	Metanol: água (60:40) v/v	Folin–Ciocalteu: Casca: 49 mgAGE·g ⁻¹ Caroço: 68,45 mgAGE·g ⁻¹	DPPH: casca (22,9%) e caroço (23,9%) FRAP: casca (0,6) e caroço (0,8) [valores de ABS] Concentração: 1000ppm	(Huber <i>et al.</i> , 2012)
Cascas de jaboticaba (<i>M. jaboticaba</i> . (Vell) Berg) liofilizadas	Álcool e ultrassom	Folin–Ciocalteu: 556,3 g AGE·kg ⁻¹	DPPH: 45,38 ± 0,50 µg·ml ⁻¹ ABTS: 9458 ± 97 µM TEAC·g ⁻¹ ORAC: 25514,24 ± 3037,24 µM TEAC·g ⁻¹	(Leite-Legatti <i>et al.</i> , 2012)
Cascas de batata doce (<i>Ipomoea batatas</i> L.)	Diferentes condições, em água	Folin–Ciocalteu: 1,02 ± 0, 20 – 6,21 ± 0,30 mg AGE·g ⁻¹ (b.s)	FRAP: 0,71–8,11 µM TEAC·g ⁻¹ (b.s)	(Anastácio e Carvalho, 2013)
Repolho roxo (<i>Brassica oleracea</i> L. var. capitata L. f. rubra)	Metanol: água: ácido tricloroacético (58:38:4) v/v/v	Antocianinas por HPLC: 2,32 mg de cianidina·g ⁻¹ (b.s)	ABTS: 86, 51 ± 2,89 PCL ACL: 208, 04 ± 41,04 PCL ACW: 35, 22 ± 0,64 Resultados expressos: µmol Trolox·g ⁻¹ (b.s)	(Wiczowski, Szawara-nowak e Topolska, 2013)
Bagaço de uva (<i>V. vinifera</i> sp)	Solvente sobre pressão, com variações nas condições	Folin–Ciocalteu: 29,1 ± 3,4 – 53,5 ± 1,8 mg AGE·g ⁻¹ (b.s)	DPPH: 2,43 ± 0,08 – 4,14 ± 0,75 mM Trolox·g ⁻¹ (b.s)	(Álvarez-Casas <i>et al.</i> , 2014)
Amostras de chocolates e achocolatados	Água: acetona: ácido acético (70:29,8:0,2) v/v/v	Folin–Ciocalteu: 2,03 ± 0,16 – 36,84 ± 0,55 mg AGE·g ⁻¹	DPPH: 12,0 ± 0,5 – 242,3 ± 3,0 ABTS: 14,7 ± 1,0 – 252,3 ± 3,0 ORAC: 68,5 ± 2,4 – 790,5 ± 3,1 FRAP: 31,8 ± 5,2 – 439,4 ± 13,1 Resultados expressos: µM Trolox·g ⁻¹	(Todorovic <i>et al.</i> , 2015)
Amêndoas (<i>Prunus dulcis</i>) Resumos dos dados sem torrefação	Etanol 80%	Folin–Ciocalteu: 7,50 ± 0,20 mg AGE·g ⁻¹ (b.s)	ABTS: 0,88 ± 0,02 mM Trolox·g ⁻¹ (b.s) DPPH: 10,20 ± 0,27 mg·mL ⁻¹ (b.s) [EC50] FRAP: 12,24 ± 0,95 mg·mL ⁻¹ (b.s) [EC50]	(Lin <i>et al.</i> , 2016)

AA – Ácido ascórbico; AGE – ácido gálico equivalente; CAE – ácido clorogênico equivalente; b.s – base seca; b.u – base úmida; DPPH: radical 2,2-difenil-1-picril hidrazina; ABTS: método do radical 2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonado; PCL ACL: método foto-quimiluminescência condição lipofílica; PCL ACW: método foto-quimiluminescência condição hidrofílica; FRAP: método da capacidade redutora do ferro; EC50 – concentração da amostra que causa redução de 50% do radical.

A maioria dos trabalhos relata alta correlação positiva entre o conteúdo fenólico e a capacidade antioxidante em diferentes métodos (Lin *et al.*, 2016; Magina *et al.*, 2010; Todorovic *et al.*, 2015; Wiczowski, Szawara-nowak e Topolska, 2013), porém essa relação pode depender do método utilizado na determinação da capacidade antioxidante, como relatado por Kevers *et al.* (2007) que constatou alta correlação de fenólicos com o DPPH e baixa com o ORAC. Os valores absolutos dos diferentes métodos de capacidade antioxidante nem sempre aumentam na mesma proporção, o que é resultado dos diferentes mecanismos envolvidos na reação (Kevers *et al.*, 2007; Tabart *et al.*, 2009).

Devido as diferentes formas de expressar os resultados, ocorre dificuldades ao se comparar os dados com a literatura. Uma das dificuldades ao comprar resultados, refere-se aos trabalhos que aplicam o método DPPH expressando o resultado em % sequestrante e não informam a diluição utilizada. Isto traz prejuízos a comparação, uma vez que para conhecer a amostra que apresenta maior capacidade antioxidante é necessário realizar o ensaio nas mesmas condições, e neste caso deve, inclui também a mesma diluição da amostra. O mesmo acontece ao aplicar o ensaio FRAP e expressar os resultados em valores de absorvância (ABS), para inferir sobre a capacidade antioxidante a diluição deve ser a mesma. Estas formas de expressar o resultado apresenta-se recorrente na literatura, sendo exemplos destes casos os trabalhos com gergelim (Oliveira *et al.*, 2011) e com as frutas mamão, manga e goiaba (Silva *et al.*, 2011). Outro inconveniente é não deixar claro a unidade em que os dados estão expressos, fato encontrado no trabalho com berinjela (Todaro *et al.*, 2009).

Apesar destes inconvenientes há muitos trabalhos que trazem corretamente as informações, e quando possível, expressa os resultados dos diferentes métodos na mesma unidade, o que facilita a interpretação. É importante frisar que ao se fazer comparações deve-se utilizar artigos com os dados consistentes e confiáveis, para minimizar erros decorrentes de comparações inadequadas, observando sempre o método aplicado, a forma de expressar o resultado, a unidade e diluição da amostra.

2 MÉTODOS ESTATÍSTICOS MULTIVARIADOS

Ao se iniciar uma pesquisa deseja-se responder alguns questionamentos. Para se obter respostas concretas é preciso usar ferramentas estatísticas antes mesmo de iniciar os experimentos, ou seja, no planejamento da pesquisa e não apenas no tratamento dos dados. Isso é ainda mais importante quando vários fatores estão envolvidos e se deseja

estudar a contribuição destes em sua resposta de interesse (Barros Neto, Scarminio e Bruns, 2010).

Uma mesma resposta pode ser obtida com diferentes métodos, porém em geral se deseja utilizar menor tempo, menor números de ensaios, o que resulta em redução dos gastos. Para que se consiga atingir o objetivo sem comprometer os dados é necessário planejar, e isto é possível ao aplicar métodos estatísticos.

O uso de métodos estatísticos multivariados com informações químicas deu origem a área conhecida como quimiometria. A quimiometria envolve a aplicação de métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada; investigar, interpretar e classificar; e fazer previsão de conjuntos de dados, extraindo o máximo de informação química com a análise dos dados obtidos (Neto, Scarminio e Bruns, 2006). O casamento entre a química, a estatística multivariada, a instrumentação analítica e a computação ocorreu no final da década de 70 e desde então tem crescido significativamente com uma variedade de métodos e aplicações.

Dentre as diversas subáreas da quimiometria podem-se destacar os planejamentos de experimentos, o reconhecimento de padrões e a calibração multivariada.

Na área de planejamento de experimentos busca-se encontrar quais as variáveis que mais afetam um determinado processo, assim como a interação entre elas. Há diversos tipos de planejamentos, os quais podem ser escolhidos de acordo com o sistema a ser estudado.

Outro método muito usado é o reconhecimento de padrões. Neste método as informações multivariadas de um conjunto de amostras, tais como medidas químicas ou espectrais, são usadas para encontrar agrupamentos de amostras similares e assim, encontrar padrões nos dados.

Outro método muito usado pelo setor produtivo, incluindo a indústria de alimentos e bebidas, é a calibração multivariada. Este método busca estabelecer um modelo que relacione medidas multivariadas espectrais realizadas em um conjunto de amostras com uma determinada propriedade das amostras, tais como concentração de um determinado componente ou alguma propriedade física (Souza e Poppi, 2012). Com o uso da calibração multivariada é possível obter um modelo capaz de realizar previsões de uma propriedade mesmo na presença de interferentes desta propriedade. Outra vantagem está em usar informações espectrais fáceis de obter a partir de amostras, com o mínimo ou

nenhum preparo e relacionar tais informações à propriedade de interesse, que em geral são difíceis de obter por algum método de referência. Assim a análise espectral rápida e simples pode ser usada em substituição ao método de referência economizando tempo, reagentes e energia.

Com sua ampla aplicabilidade e vantagens, os métodos quimiométricos são largamente aplicados com sucesso no setor produtivo como ferramenta no monitoramento de produção de cervejas e vinhos e no controle de qualidade de fármacos e alimentos, entre outros (Wold e Sjöström, 1998).

A pesquisa desta tese está fundamentada no uso de dois métodos quimiométricos: (1) delineamentos experimentais fatoriais e de mistura e (2) calibração multivariada.

Os próximos itens abordarão os métodos estatísticos multivariados aplicados nesta tese.

2.1 Delineamento fatorial Plackett-Burman

O número de ensaios necessários para se fazer um planejamento fatorial 2^k completo aumenta rapidamente com k , o número de fatores investigados (ex. $k=7$, 128 ensaios). O primeiro aspecto é que será muito moroso e dispendioso a realização de muitos ensaios. O que normalmente ocorre é que muitos desses fatores são não significativos para o modelo e que as interações de ordem alta contribui pouco para o modelo, não sendo necessários estudá-los (Barros Neto, Scarminio e Bruns, 2010).

Em muitas situações não se conhece, a priori, a relação completa de todas as variáveis que afetam significativamente a resposta. Para não correr o risco de excluir fatores importantes, faz-se necessário estudar o maior número possível de variáveis em um menor número de ensaios, usando delineamentos fracionários ao invés de fatoriais completos.

O planejamento Plackett-Burman (PBD) é um planejamento fracionário saturado que tem a finalidade de identificar os principais componentes que influenciam a resposta em estudo. Este planejamento é utilizado como triagem multifatorial rápida para encontrar os fatores independentes mais significativos, não considerando o efeito das interações (Álvarez-Casas *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2009; Plackett e Burman, 1946).

Os fatores avaliados pelo PBD são estudados por uma equação polinomial de primeira ordem. Cada fator é testado em dois níveis, baixo (-1) e alto (+1). Os fatores são organizados matricialmente com colunas ortogonais. Deste modo, os efeitos principais de cada fator podem ser determinados individualmente.

Apesar do planejamento saturado com n ensaios permitir estudar até $n - 1$ fatores, é aconselhável escolher um número menor de fatores, para que as colunas não utilizadas façam o papel de variáveis inertes (variáveis *Dummys*) e possam ser empregadas para estimar o erro associado aos contrastes.

Inicialmente, o efeito de todas as variáveis, incluindo as *Dummys*, é calculado aplicando-se a equação 3:

$$E_{X_i} = 2 \left(\frac{\sum M_i^+ - \sum M_i^-}{N} \right) \quad \text{Eq.: 3}$$

em que E_{xi} é o efeito da variável testada. M_i^+ e M_i^- refere-se a resposta em estudo a partir dos ensaios em que a variável (x_i) esteve presente em concentrações altas e baixas, respectivamente; e N é o número de ensaios.

Depois de determinar o efeito de cada variável, o desvio-padrão (SD) das variáveis *Dummys*, que serve como o desvio padrão da população, é calculado conforme a equação 4:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (E_d)^2}{n}} \quad \text{Eq.: 4}$$

em que E_d é o efeito de variáveis *Dummys*; n é o número de variáveis binárias.

Por fim, aplica-se o teste t de Student para identificar os fatores importantes (equação 5):

$$t_{v_i} = \frac{E_{X_i}}{SD} \quad \text{Eq.: 5}$$

Quanto maior for o valor absoluto do t -valor, mais significativa é a variável (Liu e Tang, 2010).

A partir do valor de t , estima-se o valor p . De acordo com o teste de hipótese, se p for menor que o nível de significância, α , rejeita-se a hipótese de que o efeito é igual ao erro.

2.2 Delineamento de mistura

Várias técnicas de otimização estão disponíveis na literatura, dentre elas os experimentos em superfície de respostas que tem como objetivo determinar a combinação de níveis das variáveis independentes que produzem respostas ótimas, com um menor número de experimentos, se comparado ao experimento fatorial clássico.

Os experimentos de misturas buscam determinar a proporção dos seus componentes que fornece a melhor resposta, com menor número de experimentos. Porém

este delineamento apresenta uma diferença em relação aos delineamentos tradicionais de superfície de respostas: as propriedades de uma mistura são determinadas pelas proporções de seus ingredientes, e não por valores absolutos (Barros Neto, Scarminio e Bruns, 2010).

Delineamentos de mistura são empregados na ciência, na engenharia e particularmente na indústria e no desenvolvimento de produtos (Altieri *et al.*, 2013; Barros Neto, Scarminio e Bruns, 2010; Borsato *et al.*, 2010).

Nos planejamentos de mistura, a soma das proporções dos componentes é constante, normalmente 100%; ou seja, as proporções dos componentes não são independentes. Logo, para uma mistura qualquer de q componentes, pode-se escrever a Equação 6.

$$\sum_{i=1}^q x_i = x_1 + x_2 + x_3 + x_3 + (\dots) + x_q = 100\% = 1 \quad \text{Eq.: 6}$$

em que x_i representa a proporção do i -ésimo componente. Esta equação retira um grau de liberdade das proporções. Para especificar a composição da mistura, é preciso fixar as proporções de $q - 1$ componentes. A proporção do último componente será sempre o que falta para completar 100%.

Independentemente do número de fatores estudados a restrição demonstrada na Equação 6 deve ser satisfeita. Sendo assim, a expressão espacial de misturas, denominada de simplex, terá uma dimensão a menos do que o número de componentes ($q - 1$): um experimento com dois componentes ($q = 2$) é expresso como uma reta; com três componentes ($q = 3$), um triângulo; e com quatro componentes ($q = 4$), um tetraedro (Figura 4).

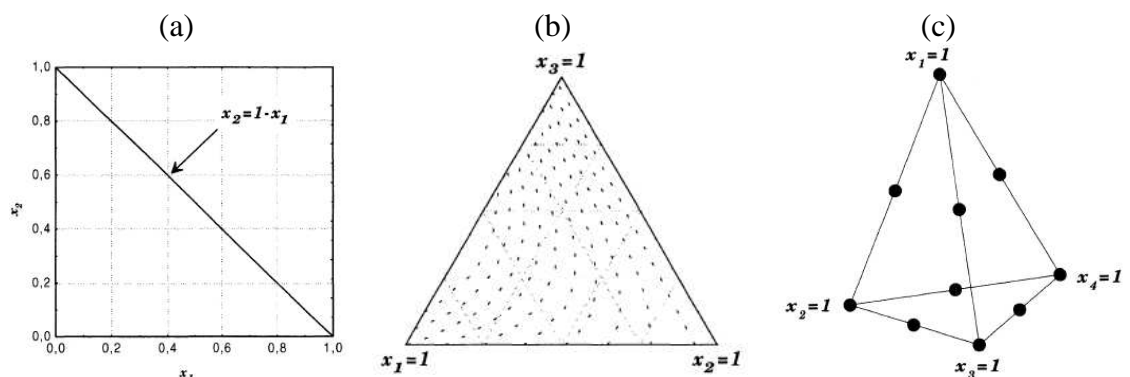


Figura 4 – Espaço experimental para experimentos de misturas de dois (a), três (b) e quatro (c) componentes

FONTE: (Barros Neto, Scarminio e Bruns, 2010).

O espaço experimental (simplex) para experimentos com dois componentes está limitado aos pontos sobre a reta $x_2 = I - x_1$ (Figura 4a). Note que a proporção dos componentes está em sentidos contrários, à medida que aumenta o componente x_1 diminui o componente x_2 .

O triângulo equilátero (Figura 4b) obedece à restrição $x_1 + x_2 + x_3 = I$, sendo utilizado para experimentos com três componentes. Todas as composições possíveis da mistura ternária são representadas pelos pontos pertencentes ao triângulo. Os vértices correspondem aos componentes puros e os lados às misturas binárias, e os pontos internos ao triângulo representa as misturas ternárias.

Para uma mistura de quatro componentes o espaço experimental é representado por um tetraedro (Figura 4c), em que cada face tem um arranjo de pontos igual ao empregado em um modelo quadrático para misturas de três componentes. Neste modelo também pode-se estudar o efeito dos componentes isolados (vértices) e das misturas binárias (arestas), terciárias (faces) e quaternárias (interior do tetraedro).

Dentro do espaço simplex são montados planejamentos de experimentos que permitem a estimativa de modelos matemáticos que irão representar o comportamento do sistema de misturas, percorrendo todo o espaço experimental, ou seja, os resultados obtidos no planejamento de mistura devem tornar possível, através dos resultados obtidos, o ajuste da equação de regressão para superfície de resposta (Reis e Andrade, 1996). São conhecidos vários modelos, os mais utilizados são o planejamento simplex básico (SLD) e o planejamento simplex centroide (SCD).

No SLD os pontos testados estão uniformemente distribuídos sobre o simplex, e é referido como $\{q, m\}$, em que q é o número de componentes da mistura e m é o grau do polinômio a ser ajustado, sendo estes termos utilizado para definir as proporções (Equação 7) (Reis e Andrade, 1996).

$$x_i = 0 + \frac{1}{m} + \frac{2}{m} + (\dots) + 1; \text{ em que } i = 1, 2, 3, \dots, q \quad \text{Eq.: 7}$$

O SCD envolve observações com todos os subconjuntos de q componentes, mas somente nas misturas em que esses componentes aparecem em iguais proporções. Neste caso o número de observações é reduzido, diminuindo assim o número de ensaios (Reis e Andrade, 1996).

Estes delineamentos (SLD ou SCD) trabalham principalmente nas fronteiras das misturas, com exceção do ponto centroide, onde os pontos experimentais apresentam-se

nas fronteiras (vértices, lados, faces, etc.) do espaço fatorial simplex, fornecendo pouca informação a respeito das interações entre os componentes da mistura. Surge a necessidade de se adicionar pontos axiais usando formulações completas, onde a maior parte dos pontos está localizada no interior do simplex. Estes delineamentos são chamados de simplex-centroide aumentado (MSCD) e são recomendados para fornecer informações sobre interações entre todos os componentes, permitindo identificar os componentes mais importantes. Na Figura 5 é mostrado o espaço simplex para três componentes com os pontos axiais.

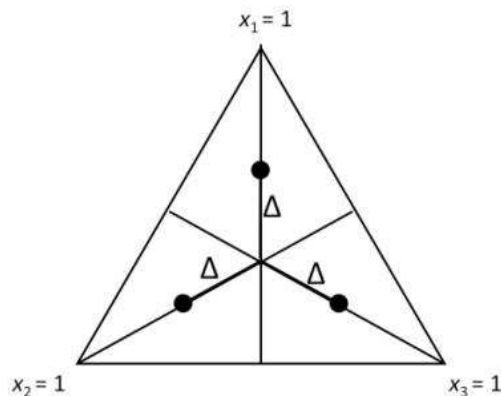


Figura 5 – Espaço experimental para experimentos de misturas de três componentes representando os pontos axiais (simplex centroide aumentado).

FONTE: (Cornell, 2002)

No MSCD, os pontos são posicionados somente sobre os eixos dos componentes. A forma mais simples é aquela na qual os pontos axiais são posicionados equidistantes do centroide geral ($1/q, 1/q, \dots, 1/q$) na direção dos vértices. A distância do centroide, medida em unidade de x_i , é denotada por Δ , e o máximo valor de Δ é $(q-1)/q$ (Cornell, 2002).

Independente do modelo seguido, ajusta-se modelos matemáticos aos dados obtidos a partir do planejamento com o objetivo de obter as equações de regressão e a superfície resposta, verificando a falta de ajuste do modelo e a estimativa dos parâmetros.

A estimativa dos parâmetros é realizada por meio da aplicação do método dos quadrados mínimos. Uma descrição detalhada e exemplos numérico pode ser encontrada em Cornell (2002). Existem inúmeras técnicas e estimativas utilizadas para testar a adequação e ajustes de modelos, utilizadas em aplicações práticas (Barros Neto, Scarminio e Bruns, 2010; Cornell, 2002): Teste de hipóteses para significância da regressão, teste da falta de ajuste, coeficiente de determinação R^2 , entre outras.

2.3 Calibração multivariada

2.3.1 Aspectos práticos da regressão multivariada

Para a realização da regressão ou calibração multivariada, o primeiro passo consiste na aquisição das informações químicas da amostra, o que na maioria das vezes é realizado obtendo um espectro da amostra. No caso da utilização de dados espectrais, essa etapa baseia-se nos resultados das leituras da intensidade do sinal para uma faixa de comprimentos de onda investigados.

As mesmas amostras analisadas espectralmente devem ser também analisadas com algum método de referência, o que normalmente exige análises por via úmida demoradas. Este é o objetivo da regressão: substituir análises demoradas e de alto custo por um simples espectro.

Após a obtenção das informações (espectros e determinações analíticas), os dados são organizados conforme apresentado na Figura 6.

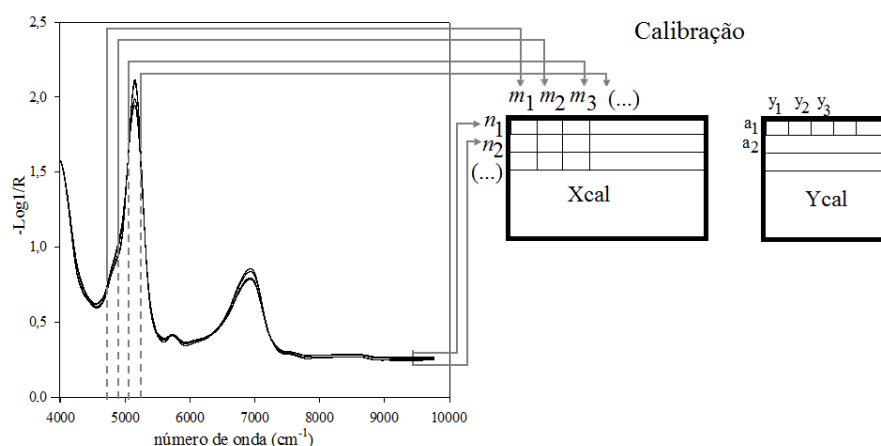


Figura 6 – Organização dos dados para calibração. n : linhas (total de amostras); m : colunas (cada comprimento de onda investigado); a_1 , a_2 : refere-se as amostras; y_1 , y_2 , y_3 : são as diferentes respostas (variável dependente) obtidas pelos métodos referências. Pode ser modelado apenas um y ou diversos.

A matriz \mathbf{X} , construída a partir das leituras espectroscópicas, é denominada de variáveis independentes. A matriz \mathbf{X} será constituída de n -linhas, que representam o total de amostras e m -colunas, que representam cada comprimento de onda investigado na obtenção do espectro. Os valores dentro da matriz são os sinais obtidos em cada comprimento de onda, para cada amostra.

O vetor \mathbf{y} , o qual é obtido a partir da análise química usando o método de referência, é denominado de variável dependente. O vetor \mathbf{y} , assim com a matriz \mathbf{X} , possui n -linhas as quais representam o total de amostras. Os valores dentro do vetor são as

determinações realizadas experimentalmente sobre a amostra usando algum método referência. Estes valores podem ser uma propriedade química (*ex.* concentração de um analito) ou física da amostra (*ex.* viscosidade). Se mais de uma propriedade é analisada de uma mesma amostra, um conjunto de vetores \mathbf{y} são obtidos e, portanto, uma matriz \mathbf{Y} pode ser organizada, conforme mostrado na Figura 6. A matriz \mathbf{X} e o vetor \mathbf{y} (ou a matriz \mathbf{Y}) são definidos como conjunto de calibração e serão usados para construir o modelo.

O conjunto de amostras utilizados para a calibração deve ser representativo da população, ou seja, todas as fontes de variações e valores reais que poderão ser encontradas em amostras futuras devem estar presentes e uniformemente distribuídas ao longo do intervalo de variação (Ferreira, 2015). Por estes motivos, em geral, quanto maior o número de amostras utilizadas e maior a variabilidade das amostras, melhor será o modelo. A definição do número de amostras para o conjunto de calibração depende da complexidade da amostra. Normalmente, recomenda-se para amostras de alimentos, um mínimo de 100 amostras representativas e com variabilidade da propriedade de interesse.

2.3.2 *Pré-tratamento dos dados*

A análise de dados multivariados depende decisivamente do pré-tratamento dos dados. Raramente os dados são usados na sua forma original (Breton, 2003), sendo geralmente transformados e/ou pré-processados antes da análise multivariada. A maioria dos tratamentos são realizados na matriz \mathbf{X} , ficando o vetor \mathbf{y} ou matriz \mathbf{Y} restritos a alguns pré-processamentos. As razões para estes tratamentos são várias, por exemplo: mover o sistema de coordenadas de forma a obter o centro em zero, dar igual peso às variáveis independentes, remover erros sistemáticos gerados pela linha de base, normalizar as variáveis independentes, maximizar diferenças entre os espectros, minimizar ruídos instrumentais, alinhar sinais, etc. (Costa, 2007), tornando a matriz de dados melhor condicionada para a análise (Souza e Poppi, 2012; Xu *et al.*, 2008).

A matriz \mathbf{X} pode ser pré-tratada em dois modos. Para distingui-los usam-se termos diferentes: Quando aplicado às linhas da matriz \mathbf{X} (amostras) é chamado transformação; porém se for aplicado às colunas (variáveis) é denominado de pré-processamento.

Antes de aplicar um determinado tratamento é de fundamental importância observar os dados graficamente para verificar como estes estão se comportando, e assim escolher o melhor tratamento. Os pré-tratamentos mais comuns para espectroscopia são: centragem na média, autoescalamento, normalização, alisamento, derivação e correção do espalhamento multiplicativo (Souza e Poppi, 2012).

Tabela 2 – Resumos das características dos pré-tratamentos de dados mais utilizados.

Transformação	Objetivos	Aplicação comum
Alisamento	Reduz a componente aleatória; aumenta a razão sinal/ruído; destaca pequenos picos	Espectroscopia e cromatografia
Primeira derivada	Remove deslocamentos da linha de base	Espectroscopia
Segunda derivada MSC (correção multiplicativa do sinal) e SNV (Padronização normal do sinal) *	Remove inclinação da linha de base Corrige espalhamento aditivos e multiplicativos na absorbância (causados por fenômenos físicos); Corrige deslocamento da linha de base	Espectros do infravermelho próximo (NIR), RAMAM e UV-vis
Normalização	Remove variações sistemáticas associadas ao tamanho da amostra. Iguala a magnitude de cada amostra	Espectros de massa e cromatografia.
Alinhamento	Remove deslocamento no eixo das abscissas	Cromatografia e ressonância magnética nuclear (RMN)
Pré-processamento	Objetivos	Aplicação mais comum
Centrar na média	Faz uma translação de eixos para o valor médio, preservando a estrutura dos dados.	Todos os dados em análise multivariada
Escalamento	Coloca as variáveis em uma mesma escala, indicado quando as unidades são diferentes ou a faixa é muito ampla.	QSAR (Relação quantitativa estrutura-atividade), outros
Autoescalamento	Realiza o procedimento de centrar na média e escalamento.	-

*A diferença entre MSC e SNV está na definição dos parâmetros utilizado na execução dos cálculos.
FONTE: (Ferreira, 2015)

Observa-se na Tabela 2 que cada tratamento corrige um determinado erro sistemático e às vezes, erros aleatórios, sendo por isso, muitas vezes utilizados em conjunto para melhor interpretação dos dados. A Figura 7 ilustra um conjunto de dados de amostras de repolho roxo que sofreram diferentes transformações.

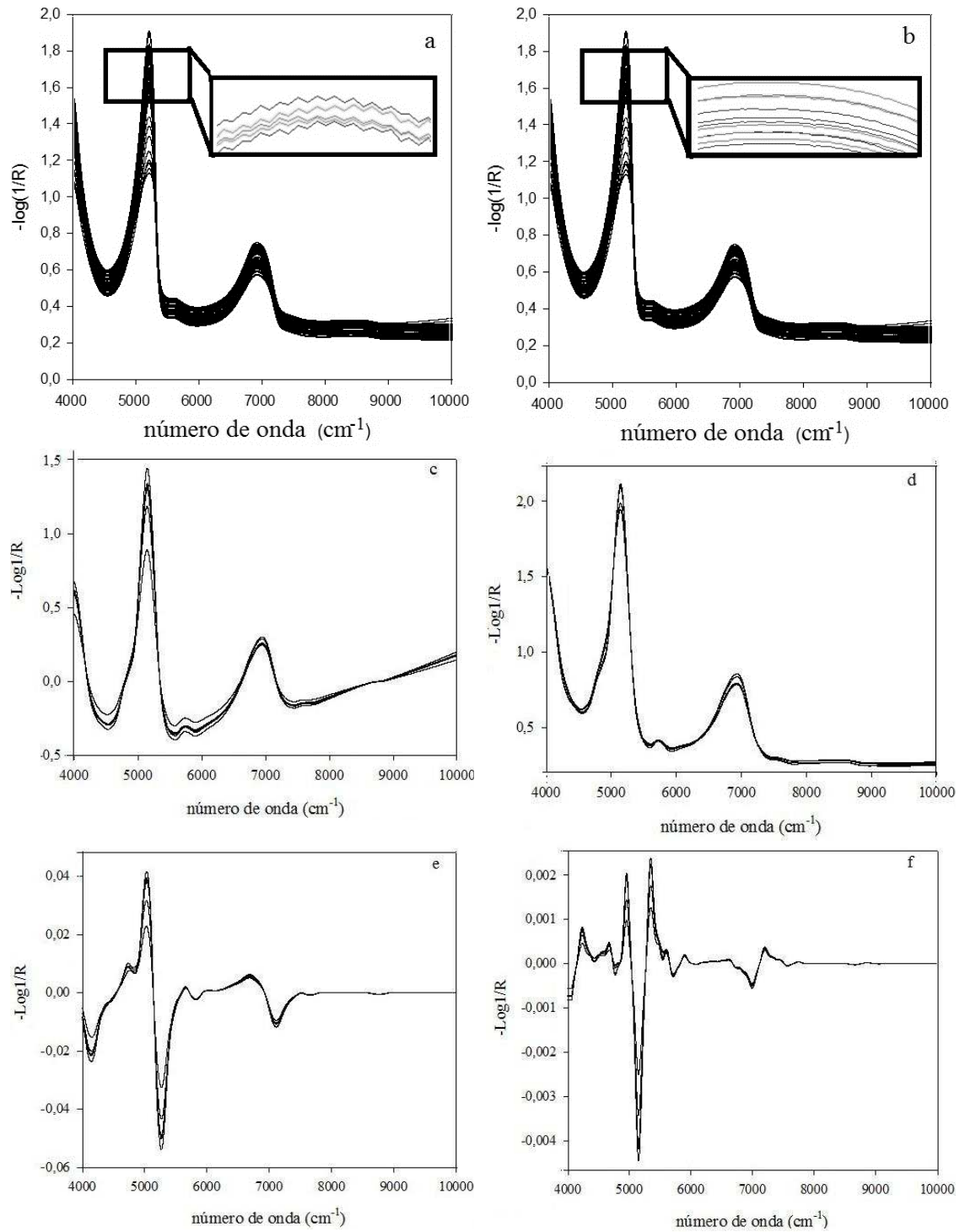


Figura 7 – Espectros de extrato de repolho roxo em água coletados por NIR com refletância difusa e background de ouro. a) espectros originais não processados. b) espectros após alisamento. c) alisados seguidos de correção da linha de base; d) alisados seguidos de MSC; e) espectros alisados seguidos de 1ª derivada. f) espectros alisados seguidos de 2ª derivada.

Através da análise da Tabela 2 e da Figura 7 é possível entender melhor o efeito de cada transformação no conjunto de dados. Melhores esclarecimentos podem ser

obtidos na literatura específica (Ferreira, 2015; Parreira, 2003; Wold e Sjöström, 1998), onde são encontrados os cálculos envolvidos, os detalhes e algumas objeções.

Os espectros apresentados na Figura 7a apresentam-se com alto ruído, especialmente na região em destaque ($5000-4000\text{ cm}^{-1}$). Após o alisamento é observado (Figura 7b) que o ruído foi reduzido e que o pico menor (próximo a 6000 cm^{-1}) ficou mais bem definido. Apesar desta correção, os espectros da Figura 7b ainda apresentam espalhamento da linha de base, que pode ser corrigido ao aplicar a função *baseline* ou MSC. Observa-se que ao aplicar a função *baseline* (Figura 7c) os dados finais continuam deslocados da linha de base, não sendo indicado este processamento, pois não corrigiu o espalhamento de todo o espectro; já ao aplicar O MSC (Figura 7e) nota-se que o deslocamento da linha de base ao longo do espectro é corrigido. Com a aplicação da 1ª derivada (Figura 7d) ocorre também correção da linha de base e os espectros estão bem mais alinhados que nos tratamentos anteriores (Figura 7c e 7d). Na Figura 7f observa-se que a linha de base está próxima ao zero das abscissas após a aplicação da 2ª derivada.

O pesquisador deverá realizar as análises de estimativa de erros após a aplicação de cada pré-tratamento, para assim garantir qual será melhor aplicado aos seus dados, porém a experiência do pesquisador é determinante para se saber por qual pré-tratamento iniciar a análise dos dados.

Após escolher o tratamento adequado é preciso escolher o método de regressão multivariada. Dentre os métodos de inversos de regressão multivariada mais utilizados podemos citar: Regressão Linear Múltipla (MLR), Regressão de Componentes Principais (PCR) e Regressão por Quadrados Mínimos Parciais (PLS). As questões a serem levantadas para a escolha do método de regressão são resumidamente apresentadas no esquema apresentado na Figura 8.

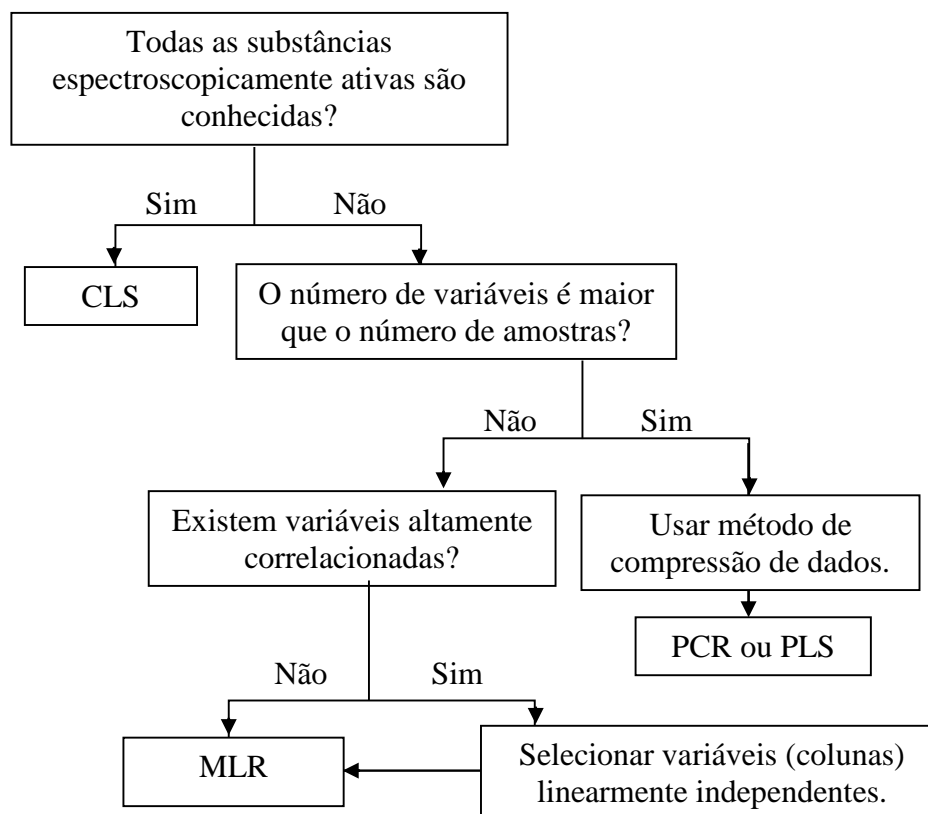


Figura 8 – Métodos multivariados de regressão mais populares e sua indicação dependendo do conjunto de dados. CLS: Regressão por quadrados mínimos clássicos; MLR – Regressão linear múltipla; PCR: Regressão por componentes principais; PLS: Regressão por quadrados mínimos parciais.

Fonte: adaptado de (Ferreira, 2015).

Em análises alimentos não se conhece todas as substâncias espectralmente ativas, logo a regressão por quadrados mínimo clássico ou direta não é indicada.

Normalmente o número de comprimentos de onda investigado em uma análise espectral é maior do que mil, e o número de amostras é raramente maior que duzentas. Deste modo, o MLR não pode ser aplicado. Além disso, sabe-se que há uma alta correlação entre os comprimentos de onda em um espectro, o que faz com que matriz \mathbf{X} construída com dados espectrais possua alta colinearidade (colunas linearmente dependentes), o que dificulta ainda mais realizar a regressão com os dados originais, mesmo após os tratamentos.

Neste caso os métodos de compressão de dados, PCR ou PLS, que não realizam a regressão com as variáveis preditoras originais (colunas de \mathbf{X}), são os escolhidos. Estes métodos são consideravelmente mais eficientes por lidar com ruídos experimentais, colinearidade e no caso do PLS, com leves não linearidades, isto melhora a qualidade do modelo e a exatidão (Teófilo, 2007).

Nestes métodos de compressão de dados, todas as variáveis originais relevantes podem ser incluídas nos modelos, podendo a calibração ser realizada mesmo na presença de interferentes, se estes forem modelados. Estes métodos são robustos, isto é, seus parâmetros praticamente não se alteram com a inclusão de novas amostras no conjunto de calibração (Geladi, 2003). Entre o PCR e o PLS, a literatura mostra com centenas de trabalhos, que a regressão PLS é, o melhor método de regressão multivariada para dados com relação linear.

2.3.3 Regressão por Quadrados Mínimos Parciais (PLS)

O método de Regressão por Quadrados Mínimos Parciais (PLS) foi inicialmente desenvolvido por Wold por volta de 1975 ao trabalhar com dados de econometria (Wold, Sjöström e Eriksson, 2001). De acordo com estes autores este método é parcial pois apesar de ser realizada várias otimizações locais nenhum critério é totalmente maximizado ou minimizado. Já para Lohmoller (1989) esta regressão é parcial pois refere-se ao particionamento dos parâmetros em subconjuntos estimáveis.

O PLS é um exemplo de método de regressão inversa, pois não exige que os espectros individuais dos constituintes de interesse, nem dos interferentes, sejam conhecidos previamente. É ainda um método quantitativo considerado eficiente principalmente por lidar com ruídos experimentais, colinearidade e não linearidade (Ferreira *et al.*, 1999). No entanto, requer análise de uma série de amostras de calibração (conjunto de calibração), cuja composição seja conhecida (Coates, 1999). Essa calibração deve levar em conta todos os fenômenos físicos e químicos que possam afetar os espectros das amostras cujas concentrações deverão ser previstas (conjunto de validação).

Há vários algoritmos para executar a regressão PLS: o algoritmo baseado na decomposição bidiagonal (PLSBdg), o NIPALS (*non-linear iterative partial least squares*), o SIMPLS, o Kernel, entre outros (Teófilo, Martins e Ferreira, 2007). Todos estes algoritmos fornecem uma mesma previsão para uma única variável dependente, sendo o PLSBdg e SIMPLS mais eficientes que os outros dois principalmente para grandes conjuntos de dados. Dentre estes, destaca-se o PLSBdg, que apresenta eficiência computacional equivalente ou levemente maior que o algoritmo SIMPLS e por isso tende a se tornar o mais empregado (Teófilo, Martins e Ferreira, 2007).

A *bidiagonalização* de matrizes é uma decomposição útil que frequentemente é utilizada como inicialização rápida em algoritmos para o cálculo da decomposição de

valores singulares de matrizes (Golub e Loan, Van, 1996). Este método considera que qualquer matriz $\mathbf{X}_{(I \times J)}$ pode ser escrita como:

$$\mathbf{X} = \mathbf{URV}^t \quad \text{Eq.: 8}$$

em que $\mathbf{U}_{(I \times J)}$, $\mathbf{V}_{(J \times J)}$ são matrizes com colunas ortonormais e elas satisfazem $\mathbf{U}^t\mathbf{U} = \mathbf{V}^t\mathbf{V} = \mathbf{I}$, e $\mathbf{R}_{(J \times J)}$ é uma matriz bidiagonal.

A decomposição bidiagonal direta, que equivale ao método PLS1 é realizada pelo algoritmo PLSBdg. No PLS existe um compromisso entre a explicação da variância em \mathbf{X} e encontrar a correlação com \mathbf{y} , sendo assim, na decomposição bidiagonal a informação em \mathbf{y} é considerada. Os novos eixos formados são equivalentes às componentes principais do PCA e são normalmente denominados de variáveis latentes (VL) (Teófilo, 2007).

Com as matrizes \mathbf{U} , \mathbf{V} e \mathbf{R} calculadas para nVL , pode-se estimar a pseudoinversa Moore-Penrose de \mathbf{X} e resolver o problema de quadrados mínimos, como mostrado a seguir:

$$\mathbf{y} = \mathbf{Xb} \text{ sendo } \mathbf{X} = \mathbf{URV}^t \text{ (pela Eq.:8),} \quad \text{Eq.: 9}$$

$$\text{temos } \rightarrow \mathbf{y} = \mathbf{U}_{nVL} \mathbf{R}_{nVL} \mathbf{V}_{nVL}^t \mathbf{b} \rightarrow \hat{\mathbf{b}} = \mathbf{V}_{nVL} \mathbf{R}_{nVL}^{-1} \mathbf{U}_{nVL}^t \mathbf{y}$$

Para fazer novas previsões basta usar o vetor de regressão estimado ($\hat{\mathbf{b}}$).

Diante disto é importante ressaltar a necessidade de se definir o número de variáveis latentes (nVL), que deve ser em número suficiente para possibilitar a modelagem sem super ajustar o modelo e também sem modelar ruídos. Um maior nVL torna o modelo melhor ajustado, porém pode estar modelando informações irrelevantes (a exemplo de ruídos); já um menor nVL pode deixar informações importantes de fora.

O método mais usado para definir o nVL é através de validação cruzada empregando as amostras do conjunto de calibração (Martens e Naes, 1996). Sendo necessário calcular os erros quadrático médio de calibração (RMSEC) e da calibração com validação cruzada (RMSECV) para cada nVL . O número mais adequado de VL será o correspondente ao menor valor de RMSECV (Martens e Naes, 1996).

$$\text{RMSEC, RMSECV, RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{N}} \quad \text{Eq.:10}$$

em que N representa o número de amostras do conjunto de calibração ou do conjunto de validação ou de previsão, y_i é o valor medido da propriedade e \hat{y}_i é o valor previsto pelo modelo para i -ésima amostra. As unidades dos erros são relativas às unidades dos valores em y .

A Figura 9 mostra a variação do erro quadrático médio de calibração (RMSEC) e o erro quadrático médio de calibração com validação cruzada (RMSECV) pelo número de variáveis latentes (nVL).

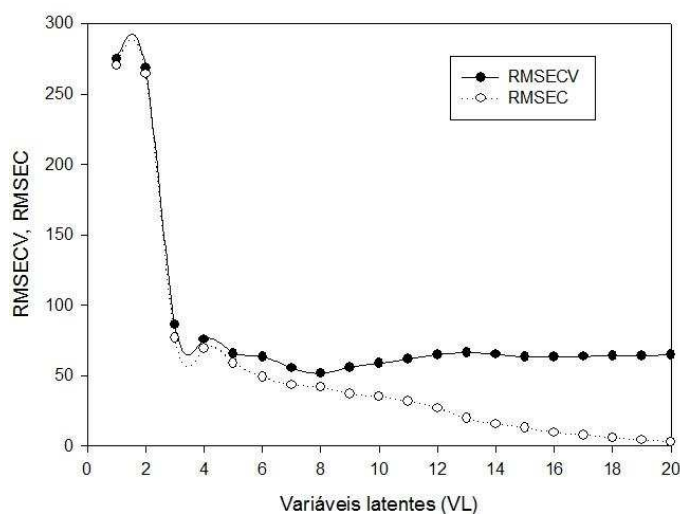


Figura 9 – Representação gráfica do conjunto do erro quadrático médio de calibração (RMSEC) e erro quadrático médio de calibração com validação cruzada (RMSECV) em função do Número de variáveis latentes (nVL).

Observa-se que o RMSEC e o RMSECV diminuem com o aumento da complexidade do modelo, ou seja, com o aumento do número de variáveis latentes utilizado, até um ponto onde o aumento da complexidade (aumento de nVL) não reduz significativamente os erros. Diante disto, neste exemplo deverá ser escolhido 8 VL, onde o RMSECV apresenta o menor valor.

Ao observar o conjunto de calibração, deve-se assegurar que as amostras formam um conjunto homogêneo, removendo aquelas amostras que são solitárias (*outliers*). A detecção destas amostras anômalas (*outliers*) é tão importante quanto a determinação do nVL empregadas no desenvolvimento do modelo. As variações destas amostras podem ter diferentes causas, tais como: erros de medição, amostras provenientes de outras populações, etc. (Valderrama, Braga e Poppi, 2007).

Para a detecção de *outliers* é necessário a aplicação de métodos robustos, uma delas aplica duas grandezas complementares: *leverage* e resíduos de Student. O primeiro deles, conhecido também como poder de alavancagem, faz referência a altos resíduos na matriz \mathbf{X} , isto é, nos dados espectrais; já o outro refere-se aos altos resíduos na matriz \mathbf{Y} (ou vetor \mathbf{y}), ou seja, os valores de referência do analito (Bro e Andersen, 2003; Valderrama, Braga e Poppi, 2007).

Os valores de *leverage* e resíduos de Student são calculados através das Equações 11 e 12, respectivamente.

$$H_i = \frac{1}{N} + (\mathbf{x}_i - \bar{\mathbf{x}})(\mathbf{X}^T\mathbf{X})^{-1}(\mathbf{x}_i - \bar{\mathbf{x}})^T \quad \text{Eq.: 11}$$

em que H_i corresponde ao valor de *leverage* da i -ésima amostra e \mathbf{X} é uma matriz que contém os espectros. \mathbf{X} tem linhas N , correspondente ao número de amostras, e K colunas, que correspondem aos comprimentos de onda. \mathbf{x}_i é o espectro para a i -ésima amostra, e $\bar{\mathbf{x}}$ representa a média dos espectros.

$$Lresc_i = \sqrt{\frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{(N-1)(1-H_i)}} \quad SR_i = \frac{(y_i - \hat{y}_i)}{Lresc_i\sqrt{(1-H_i)}} \quad \text{Eq.: 12}$$

em que $Lresc_i$ corresponde ao resíduo da i -ésima amostra, normalizada pelo seu valor de *leverage*, SR_i representa o resíduo de Student, e y_i e \hat{y}_i são, respectivamente, os valores de medidos e estimados das propriedades para a i -ésima amostra.

Gráficos usando estes parâmetros (Figura 10a) são gerados para auxiliar na remoção das *outliers*. As amostras que apresentaram alto *leverage* ($> \frac{3VL+1}{n^\circ \text{ amostras na calibração}}$) e/ou resíduos de Student elevados ($>2,5$) apresentam efeitos significativamente negativos ao modelo, sendo considerados *outliers* e removidas do modelo (Ferreira *et al.*, 1999).

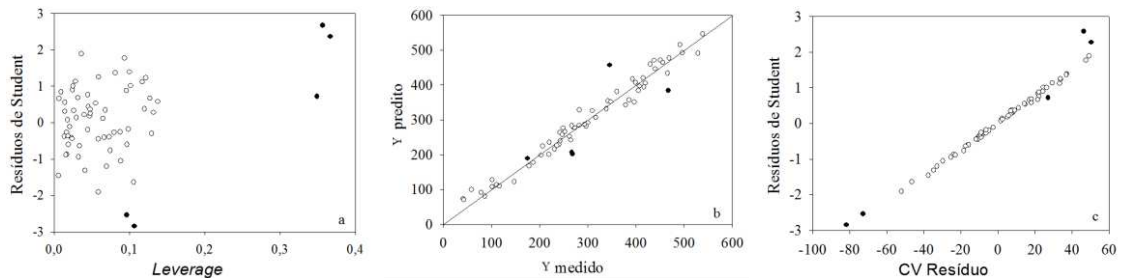


Figura 10 – Representação gráfica do modelo de predição hipotético. a) *leverage* versus resíduos de Student; b) medido vs preditos; c) Resíduos: Student vs validação cruzada. Amostras em destaque (●) são consideradas *outliers*

Outros gráficos também auxiliam na remoção de *outliers*: y_{medido} vs y_{predito} (Figura 10b), em que as amostras que desviam da tendência linear entre os valores preditos e medidos apresentam alto RMSEC e podem ser removidas; e os resíduos de Student vs resíduos da validação cruzada (Figura 10c), valores altos destes resíduos são provenientes de *outliers*.

2.3.4 Seleção de variáveis

Nos métodos multivariados, muitas vezes faz-se necessária a seleção de variáveis, não devido às limitações apresentadas pelo método, mas devido ao fato dos dados

poderem apresentar variáveis com alta colinearidade, como no caso de espectros, ou variáveis que não contribuem fortemente para a construção de um bom modelo de regressão (Parreira, 2003).

A seleção de variáveis permite identificar um subconjunto de variáveis (da matriz \mathbf{X}) que melhor se correlaciona com a propriedade de interesse (\mathbf{y}). Uma adequada seleção permite minimizar os erros do modelo de calibração, melhorando sua eficiência, tornando-o mais preciso, exato, simples e robusto (Herrero e Cruz Ortiz, 1999; Oliveira *et al.*, 2004).

Na literatura há uma gama de procedimentos para seleção de variáveis (Chong e Jun, 2005), onde a maioria visa a seleção de comprimentos de onda em espectroscopia. Dentre os métodos de seleção destaca-se a seleção de preditores ordenados (OPS).

No método OPS é necessário a escolha de um vetor informativo, o qual é obtido através de cálculos matemáticos envolvendo os dados. A região onde há maior intensidade do sinal destes vetores são intuitivamente relacionados às regiões que podem melhorar o modelo, sendo estas as regiões selecionadas seguindo uma ordenação decrescente do sinal (Teófilo, 2007).

Alguns vetores informativos recomendados são: vetor de correlação, vetor de regressão, soma quadrática dos resíduos e combinações destes (Teófilo, 2007), sendo o vetor de regressão o mais utilizado como ferramenta informativa.

O método OPS (Teófilo, 2007) segue um procedimento simples para seleção de variáveis, o qual é realizado em poucas etapas (Figura 11).

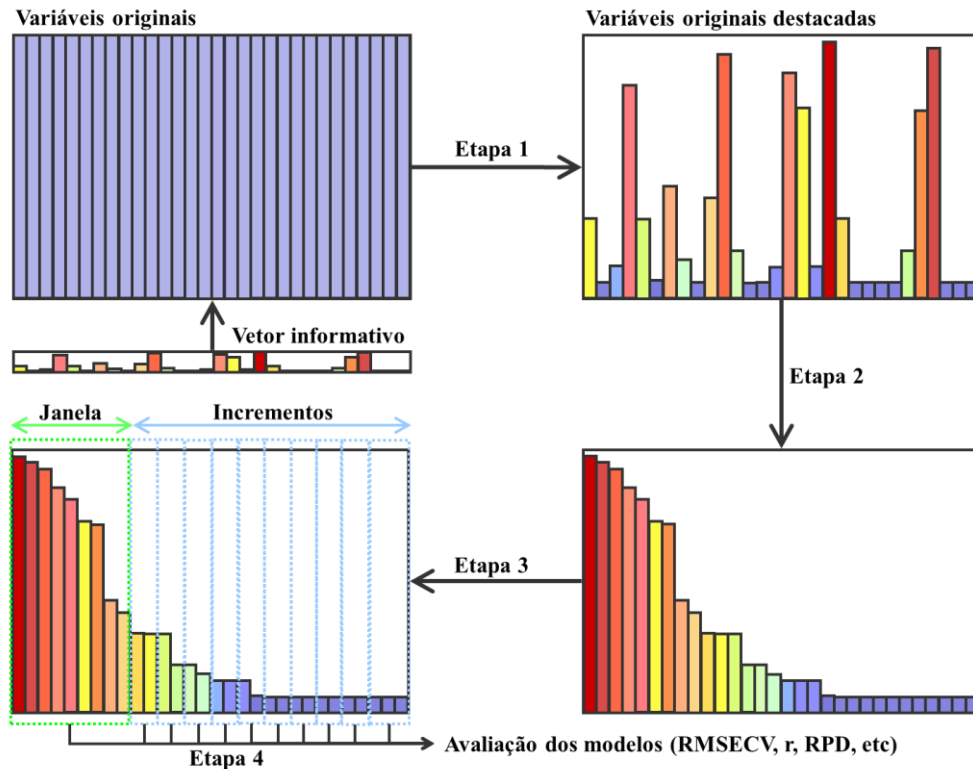


Figura 11 – Etapas da seleção de variáveis usando o OPS. RMSECV: erro quadrático médio de calibração com validação cruzada, r: coeficiente de correlação, RPD: relação de desempenho do desvio.
Fonte:(Teófilo, 2007)

As etapas para o OPS são: 1) Inicia-se a análise selecionando o vetor informativo; 2) ordenam-se as colunas da matriz \mathbf{X} na ordem de importância indicada pelas intensidades do vetor selecionado. Sendo assim, a coluna indicada pelo vetor como a mais informativa será realocada para a primeira coluna e a coluna com menor informação na última coluna da matriz; 3) As variáveis ordenadas são avaliadas por métodos de validação cruzada, como o método de regressão PLS: inicialmente com uma janela com as variáveis mais importantes (primeiras colunas), seguindo de análise com incrementos fixos até a completa análise de toda matriz. A cada conjunto de variáveis são calculados os parâmetros estatísticos (ex.: RMSECV, r, RPD); 4) Por fim, ocorre a comparação e avaliação dos modelos a partir dos parâmetros calculados e escolhe o conjunto de variáveis selecionadas, sendo escolhido as variáveis que geram os modelos que apresentam os melhores parâmetros de qualidade (menores erros e melhor previsão).

Existem diversas vantagens ao se aplicar a seleção de variáveis pelo OPS, dentre elas pode-se citar: esta seleção pode ser aplicada a qualquer tipo de dado; apresenta objetividade na seleção de variáveis; são necessários poucos parâmetros de entrada para

executar a seleção em relação a outros métodos; apresenta eficiência computacional e aptidão para se tornar completamente automático; entre outros (Teófilo, R. F., Martins e Ferreira, 2007; Teófilo, 2007).

2.3.5 Validação do modelo construído

Para verificar se o modelo é preditivo é necessário que este seja validado, ou seja, verificar se o mesmo apresenta-se de forma adequada, e dentro dos objetivos desejados.

Nesta etapa o modelo é testado quanto a sua capacidade preditiva e otimizado para tal. O método mais utilizado é a validação cruzada, sendo realizada pela comparação das previsões das concentrações previamente conhecidas (Ferreira *et al.*, 1999). Este método é utilizado durante a construção do modelo, sendo conhecido como validação interna. A validação cruzada seguindo o procedimento dos subconjuntos aleatórios é bastante empregada para este fim.

Em um segundo momento, após obtenção do melhor modelo, este precisa ser avaliado com amostras externas, tendo como objetivo verificar a capacidade de previsão do modelo e garantir previsões confiáveis para as amostras desconhecidas. Para a validação externa (Figura 12) utiliza-se um novo conjunto de amostras externas, as quais não devem ter participado do conjunto utilizado na calibração. Os dados são então pré-tratados da mesma maneira como feito para o conjunto de calibração e, finalmente, aplica-se o modelo construído para prever as propriedades anteriormente modeladas.

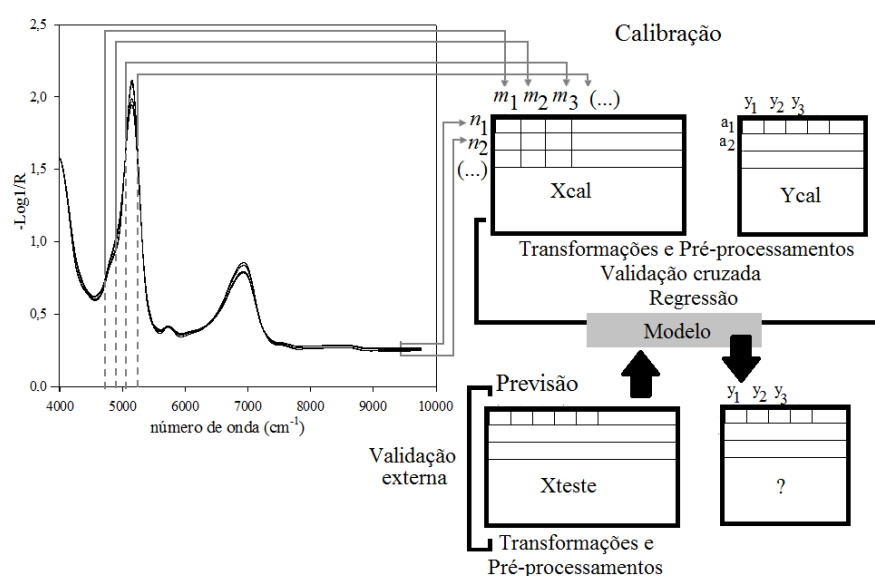


Figura 12 – Esquema usado para construir e validar o modelo. n : linhas (total de amostras); m : colunas (cada comprimento de onda investigado); a_1, a_2 : refere-se as amostras; y_1, y_2, y_3 : são as diferentes respostas (variável dependente) obtidas pelos métodos referências. Pode ser modelado apenas um y ou diversos.

A validação externa é realizada e os modelos preditivos são avaliados por parâmetros estatísticos, para verificar em que situação o modelo apresentou maior capacidade de previsão. São considerados preditivos os modelos que apresentam menor RMSEP (Equação 13) e maior coeficiente de correlação de validação (Equação 14) e elevada correlação de desempenho do desvio (Equação 15).

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{N}} \quad \text{Eq.: 13} \quad r = \frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sqrt{s^2(y) \times s^2(\hat{y})}} \quad \text{Eq.: 14} \quad \text{RPD} = \frac{\text{DP}}{\text{RMSECV}} \quad \text{Eq.: 15}$$

em que RMSEP é o erro quadrático médio de previsão; r é o coeficiente de correlação entre os valores medidos e previstos; $s^2(y)$ e $s^2(\hat{y})$ são, respectivamente, a variância entre os valores medidos e previstos para a propriedade y ; RPD é relação de desempenho do desvio; DP é desvio padrão dos valores estimados pela validação cruzada e RMSECV é o erro quadrático da validação cruzada.

A etapa de validação deve ser realizada periodicamente, pois pode ocorrer problemas instrumentais (desgastes de peças, desalinhamento, etc.) ou das amostras (tempo, novos métodos de obtenção, etc.) que inviabilizem a utilização do modelo. Se ocorrer tais problemas é necessário a atualização do modelo, incluindo as novas amostras no conjunto de calibração, por exemplo.

3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

A região espectral do infravermelho refere-se a faixa de comprimentos de onda (λ) do espectro eletromagnético imediatamente superior à região visível (Figura 13). Esta região pode ser subdividida em outras três, que são denominadas com relação a sua distância à região do visível: infravermelho próximo (NIR), médio (MID) e distante (FAR), conforme detalhado no esquema da Figura 13.

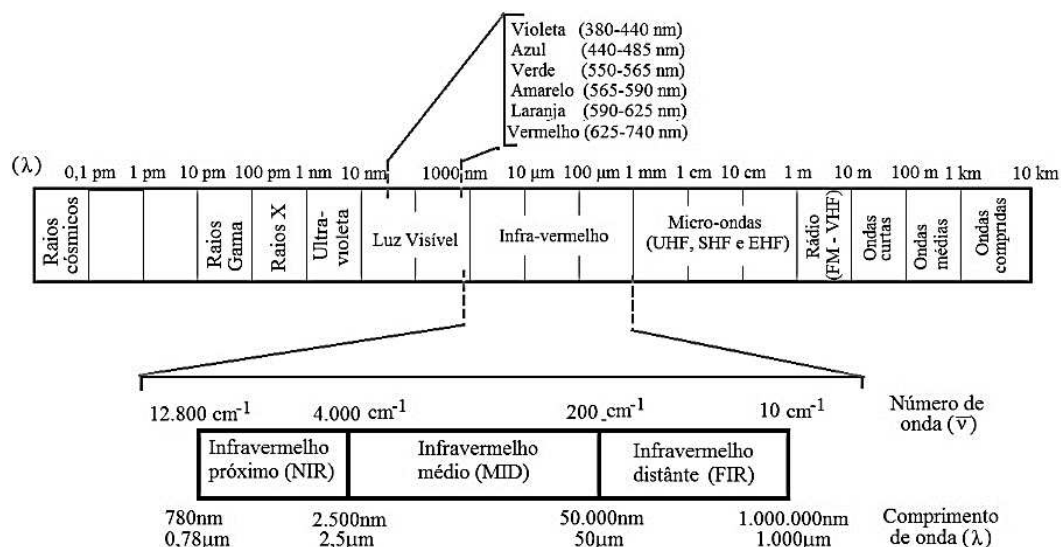


Figura 13 – Representação do espectro eletromagnético com seus respectivos comprimentos de onda (λ).

A radiação do infravermelho, por possuir maior comprimento de onda possui menor energia, sendo essa energia suficiente para provocar alterações vibracionais ou rotacionais nas moléculas. As alterações moleculares podem ser classificadas em dois tipos: vibrações de deformação axial (*stretching*) e de deformação angular (*bending*), conforme mostrado na Figura 14.

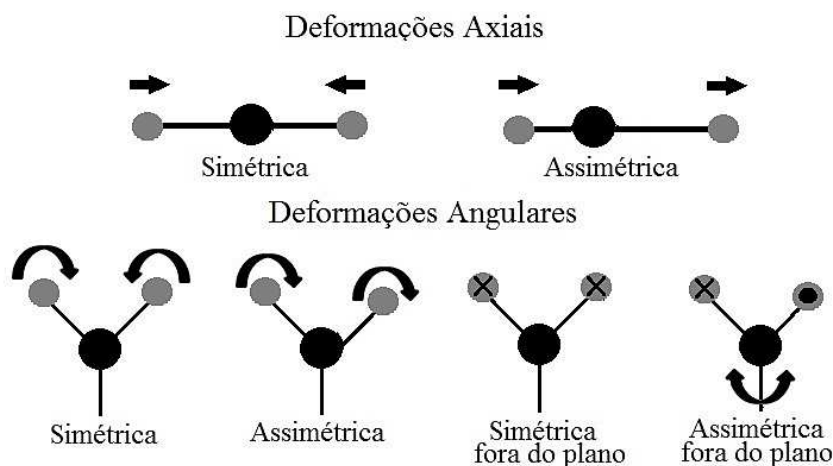


Figura 14 – Representação das vibrações de deformações axiais e angulares. ● e ×: indicam movimentos para dentro e fora do plano do desenho, respectivamente.

As deformações axiais, ou estiramento, ocorrem quando a ligação entre os átomos sofre compressão ou estiramento, podendo ser simétrica ou assimétrica. Observa-se que no estiramento simétrico não há alteração no momento dipolo da molécula. As deformações angulares envolvem mudanças dos ângulos entre as ligações (no plano) ou alterações do ângulo entre o plano que contém as ligações e um plano de referência (fora do plano). As deformações angulares no plano e fora do plano são equivalentes,

modificando apenas o referencial. Apenas as vibrações que causam alteração no momento dipolo da molécula apresentam absorção no infravermelho, sendo as vibrações de estiramento mais intensas que as deformações angulares (Barbosa, 2008).

O MID (200 a 4000 cm^{-1}) gera espectros que apresenta vibrações fundamentais, onde as bandas são intensas e bem definidas, ou seja, é nesta região que ocorre as vibrações propriamente ditas. Já o NIR (400 a 12800 cm^{-1}) gera espectros que apresentam sobreposições de bandas, os sobretons das vibrações fundamentais, além das bandas de combinações de vibrações fundamentais. Os sobretons são bandas com valores de frequência correspondentes a múltiplos inteiros das vibrações normais; e as bandas de combinação são combinações lineares das frequências normais ou múltiplos inteiros destas (Pasquini, 2003). As bandas de combinação acontecem quando duas frequências vibracionais (ν_1 e ν_2) acoplam-se em uma molécula, dando origem à vibração de uma nova frequência dentro da molécula (Kellner *et al.*, 2004). Na região do infravermelho próximo e médio podem ocorrer múltiplas transições vibracionais, provocando variação do momento de dipolo das moléculas, mas nunca transições eletrônicas (Araujo, 2007).

Os espectros de infravermelho possuem grande quantidade de informação a respeito da organização da maioria dos compostos. Esta técnica permite a análise qualitativa de compostos orgânicos porque os modos característicos de vibração de cada grupo provocam o aparecimento de bandas no espectro infravermelho em frequências específicas, que também são influenciadas pela presença de grupos funcionais próximos (acoplamentos) (Rohman e Man, 2010).

A interação da radiação eletromagnética (absorção, reflexão e espalhamento) com a matéria são características dos átomos presentes nas moléculas, bem como da região do espectro envolvida, permitindo a identificação de compostos (Silverstein *et al.*, 2014). A absorção de energia de alguns grupos pode ser observada na Tabela 3.

Tabela 3 – Faixas de número de onda relacionadas ao comportamento de alguns grupos funcionais no infravermelho médio (MID) e próximo (NIR)

Grupos funcionais	Número de onda (cm⁻¹)		Comentários
O-H	MID	3650 – 3600(m,a)	Álcoois e fenóis sem ligação de hidrogenio
		3400 – 3200 (m,l)	Álcoois e fenóis associados a ligação de hidrogênio
		3400 – 2500 (m,l)	Ácido carboxílico
	NIR	7143 – 6250	1° sobreton
		10526 – 9091	2° sobreton
		5000 – 4545	Combinação
N-H	MID	3500 – 3100 (m)	Aminas primárias e secundárias
		1640 – 1550(F,m)	
		900 – 650 (f)	
	NIR	7143 – 6250	1° sobreton
		10526 – 9091	2° sobreton
		12903 – 11765	3° sobreton
C-N	MID	1300 – 1000(v, F)	-
		3300(F,a)	Apenas em caso alquino terminal
C-H	MID	6173 – 5556	1° sobreton
		9091 – 8163	2° sobreton
	NIR	11765 – 10526	3° sobreton
		4545 – 4065	Combinação
		7692 – 7042	
C-O	MID	1300 – 1000(F)	Éteres, esteres, álcoois, fenóis, ác. graxos e anidros
C-X	MID	<670 (F)	Brometo
		785 – 540 (F)	Cloreto
		1400 – 1000 (F)	Fluoreto
S-H	NIR	16667 – 14286	Enxofre (combinação)
	MID	2600 – 2500(f)	Acompanhada de uma banda C-S (800-600 cm ⁻¹)
NIR		4000	Combinação
S=O	MID	1350 – 1310(F)	-
		1160 – 1120 (F)	
S-S	NIR	9804 – 9434	Combinação
		22222 – 18182	Combinação

Abreviações relacionadas a intensidade e formato das bandas: Forte (F), fraca (f), média (m), variável (v), larga (l) e aguda(a).

Fonte: adaptado de (Barbosa, 2008; Stuart, 2004).

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica rápida, requer o mínimo necessário de preparo de amostras e sua instrumentação é facilmente encontrada nos laboratórios. O uso da FTIR apresenta diversas vantagens, entre elas: relação sinal/ruído, obtenção de espectros em segundos, uso de pequenas

quantidades de amostra, boa precisão, etc. No entanto, como os picos e bandas nos espectros de infravermelho na maioria das vezes se sobrepõe em análise de amostras complexas, com as de alimentos, os métodos quimiométricos são obrigatórios na análise deste tipo de dado para se extrair a informação química desejada (Souza e Poppi, 2012).

Os métodos mais usados para obtenção dos espectros envolvem transmissão ou refletância, sendo utilizado diversos acessórios para obter os espectros de amostras de diversas naturezas (sólidas, líquidas e gasosas). O método de refletância é bastante útil para amostras sólidas de difícil preparo (alimentos, resinas e outras). A transmitância é usada para amostras líquidas ou filmes sólidos, que possuem transparência suficiente para passagem da radiação.

Um espectro de infravermelho geralmente contém mais informação do que apenas os valores de posição ou de absorção de alguns picos, atuando como uma impressão digital de uma dada amostra quando utilizado integralmente (Souza e Poppi, 2012). Na calibração multivariada todo o espectro é utilizado na construção da matriz **X**.

O NIR e o MID são técnicas que permitem a determinação de propriedades físicas e químicas de alimentos através de seus respectivos espectros e têm sido cada vez mais empregadas no controle de qualidade e na caracterização qualitativa e quantitativa de produtos alimentícios (Blanco *et al.*, 1999).

3.1 Aplicação do infravermelho em alimentos

Em vista da imensa gama de informações contidas no espectro do infravermelho, não surpreende que a técnica tenha se mostrado uma ferramenta analítica em muitas áreas, como meio ambiente, biomédica, farmacêutica, nas indústrias alimentícia, petroquímica, têxtil, entre outras (Cen e He, 2007; Pasquini, 2003).

O NIR e o MID vêm sendo utilizado como um método não destrutivo que ao se correlacionar com análises laboratoriais gera um modelo estatístico que explica as informações espectrais. Existem diversos trabalhos na literatura que faz uso destas técnicas na área de alimentos. A Tabela 4 apresenta algumas aplicações em diversas fontes alimentares (bebidas, grãos, extratos, folhas, etc.), dentre as aplicações destaca-se principalmente as propriedades bioativas, que é um dos objetivos da presente tese.

Tabela 4 – Aplicação do infravermelho em alimentos

Material	Respostas estudadas	Região do espectro	Pré-tratamentos	Métodos quimiométricos	Referência
Sucos	Açúcares	NIR (10000-4000 cm ⁻¹)	Centrar na média, alisamento, SNV e 2ª derivada	PLS	(Rodríguez-Saona <i>et al.</i> , 2001)
Produtos de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Sólidos totais, Brix, Licopeno e betacaroteno	NIR (10000-4000 cm ⁻¹)	Alisamento, MSC e 2ª derivada	PLS	(Pedro e Ferreira, 2005)
Mirtilo (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.)	Fenólicos, flavonóides, antocianinas, ác. ascórbico	NIR e MID 13000-4000-700 cm ⁻¹	SNV, 1ª derivada	PCA e PLS	(Sinelli <i>et al.</i> , 2009)
Vinhos	Capacidade antioxidante	MID (4400-600 cm ⁻¹)	Centrado na média	PLS	(Versari <i>et al.</i> , 2010)
Cebolas (<i>Allium Cepa</i> e <i>oschaninii</i>)	Fenólicos e capacidade antioxidante	MID (4000–400 cm ⁻¹)	Normalização, baseline, alisamento e 2ª derivada	PCA-DFA, PLS	(Lu <i>et al.</i> , 2011)
Chá verde (<i>Camellia sinensis</i> L.)	Capacidade antioxidante	NIR (10000-4000 cm ⁻¹)	SNV, centrar na média, autoescalado, MSC e normalização	PLS, SVM, BP-ANN	(Chen <i>et al.</i> , 2012)
Extrato de bambu (<i>Phyllostachys Sieb. et Zucc</i>)	Capacidade antioxidante	NIR (12500-4000 cm ⁻¹)	Alisamento, MSC, 1ª derivada, SNV	PLS, MRL, BP-ANN, LS-SVM	(Wu <i>et al.</i> , 2012)
Sorgo (<i>Sorghum bicolour</i> (L.) Moench)	Fenóis, taninos condensados e antocianina	NIR (25000-4000 cm ⁻¹)	Vários pré-tratamentos (Não informou quais)	PLS modificado	(Dykes <i>et al.</i> , 2014)
Vinhos tintos (<i>Vitis Vinífera</i>)	Fenólicos	UV/VIS/NIR (52630-4000 cm ⁻¹)	SNV, MSC, autoescalado, 1ª e 2ª derivada, normalização, baseline	PLS e PCR	(Martelo-Vidal e Vázquez, 2014)
Menta (<i>Mentha haplocalyx</i> Briq.)	Fenólicos, flavonoides, polissacarídeos e capacidade antioxidante	NIR (12500-4000 cm ⁻¹)	SNV, MSC, 1ª e 2ª derivada, DOSC	PLS, LS – SVM, LDA, KNN, PCA	(Dong, Ni e Kokot, 2014)
Erva mate (<i>Ilex Paraguariensis</i>)	Fenólicos	NIR (10000-4000 cm ⁻¹)	MSC, 1ª derivada e alisamento	PCA e PLS	(Frizon <i>et al.</i> , 2015)

Correção da linha de base (*Baseline*); Correção multiplicativa do sinal (MSC); Padronização normal do sinal (SNV) Análise de componentes principais (PCA); análise de função discriminante (DFA); Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLS); Vetor suporte (SVM); Redes neurais artificiais (BP-ANN); Regressão linear múltipla (MLR); Mínimos Quadrados-Vetor suporte (LS – SVM), Regressão dos componentes principais (PCR); Análise discriminante linear (LDA), Reconhecimento de padrões supervisionada dos K-vizinhos mais próximos (KNN); Correção direta ortogonal do sinal (DOSC); Análise dos componentes principais (PCA); NIR (infravermelho próximo). MID (infravermelho médio).

A espectrometria do infravermelho associada a técnicas multivariada vêm sendo aplicada com sucesso em diversos materiais, desde a análise em sementes, frutos e folhas (Dong, Ni e Kokot, 2014; Dykes *et al.*, 2014; Frizon *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2011; Sinelli *et al.*, 2009), como também em produtos acabados (Chen *et al.*, 2012; Martelo-Vidal e Vázquez, 2014; Pedro e Ferreira, 2005; Rodriguez-Saona *et al.*, 2001; Versari *et al.*, 2010), sendo possível prever diversas propriedades.

Com a espectrometria NIR e MID, ao trabalhar com mirtilos, foi possível construir bons modelos para a determinação de compostos fenólicos, porém não foi possível modelar as determinações de ácido ascórbico (Sinelli *et al.*, 2009), sendo os resultado promissores devido aos elevados valores de correlação e RPD.

Dente as diversas técnicas que visam correlacionar a espectrometria infravermelho com as análises de referência, nota-se pela Tabela 4 que o PLS é o mais comumente aplicado, apresentando boas previsões.

O pré-tratamento dos dados espectrais é muitas vezes necessários, para se conseguir modelar melhor as respostas de interesse, sendo que os tratamentos mais recorrentes e que geram os melhore resultados são o alisamento e a correções da linha de base.

4 REFERÊNCIAS

ALTIERI, C. *et al.* Using a simplex centroid to study the effects of pH, temperature and lactulose on the viability of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in a model system. **Anaerobe**, v. 23, p. 23–26, 2013.

ÁLVAREZ-CASAS, M. *et al.* Effect of experimental parameters in the pressurized solvent extraction of polyphenolic compounds from white grape marc. **Food chemistry**, v. 157, p. 524–32, 15 ago. 2014.

ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202–2210, 2010.

ANASTÁCIO, A.; CARVALHO, I. S. Phenolics extraction from sweet potato peels: Key factors screening through a Placket–Burman design. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 99–105, maio 2013.

APAK, R. *et al.* Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. **Molecules**, v. 12, p. 1496–1547, 2007.

ARAÚJO, A. M. **Monitoramento de processos em tempo real via espectrofotometria no infravermelho próximo**. 89. (Mestrado em Engenharia de Processos). Universidade Tiradentes, 2007.

BARBOSA, L. C. DE A. **Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: Editora UFV, 2008. 189p.

BARROS NETO, B. DE; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 413p.

BLANCO, M. *et al.* Calibration in non-linear near infrared reflectance spectroscopy : a comparison of several methods. **Analytical Chemistry**, v. 384, p. 207–214, 1999.

BORSATO, D. *et al.* Aplicação do delineamento simplex-centroide no estudo da cinética da oxidação de biodiesel B100 em mistura com antioxidantes sintéticos. **Química Nova**, v. 33, p. 1726–1731, 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25–30, jan. 1995.

BRERETON, R. G. **Chemometrics. Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant**. Chichester: John Wiley & Sons, Inc., 2003. 504p.

BRO, R.; ANDERSEN, C. M. Theory of net analyte signal vectors in inverse regression. **Journal of Chemometrics**, v. 17, p. 646–652, 2003.

CEN, H.; HE, Y. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. v. 18, p. 72–83, 2007.

CHEN, Q. *et al.* Comparisons of different regressions tools in measurement of antioxidant activity in green tea using near infrared spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 60, p. 92–97, 2012.

CHEN, Z.; BERTIN, R.; FROLDI, G. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH* assay using several statistical programs. **Food Chemistry**, v. 138, p. 414–420, 2013.

CHONG, I. G.; JUN, C. H. Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 78, p. 103–112, 2005.

COATES, J. A review of current and new Technology: Used in instrumentation for industrial vibrational spectroscopy. **Spectroscopy**, v. 14, p. 21–34, 1999.

CORNELL, J. A. **Experiments with Mixtures: Designs, Models, and the Analysis of Mixture Data**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2002. 680p.

COSTA, A. M. S. DA. **Desenvolvimento de metodologia instrumental rápida para a análise de alimentos**. 132p. (Mestrado em Química e Qualidade de Alimentos). Universidade de Aveiro, 2007.

DONG, W.; NI, Y.; KOKOT, S. A novel near-infrared spectroscopy and chemometrics method for rapid analysis of several chemical components and antioxidant activity of mint (*mentha haplocalyx* briq.) samples. **Applied Spectroscopy**, v. 68, p. 245–254, 2014.

DYKES, L. *et al.* Prediction of total phenols , condensed tannins , and 3-deoxyanthocyanidins in sorghum grain using near-infrared (NIR) spectroscopy. **Journal of Cereal Science**, v. 60, p. 138–142, 2014.

FERREIRA, I. C. F. R. *et al.* Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1511–1516, 2007.

FERREIRA, M. M. C. *et al.* Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, p. 724–731, 1999.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria : Conceitos, Métodos e Aplicações**. Unicamp ed. Campinas, SP: 2015. 496p.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p. 1061–1080, 1995.

FRIZON, C. N. T. *et al.* Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 795–801, 2015.

GELADI, P. Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 58, p. 767–782, 2003.

GOLUB, G. H. .; LOAN, C. F. VAN. **Matrix Computation**. 3rd. ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1996. 278p.

HALLIWELL, B. *et al.* Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 35, p. 7–20, 1995.

HERRERO, A.; CRUZ ORTIZ, M. Qualitative and quantitative aspects of the application of genetic algorithm-based variable selection in polarography and stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 378, p. 245–259, 1999.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, p. 1841–56, 2005.

HUBER, K. *et al.* Caracterização química do resíduo agroindustrial da manga ubá (*Mangifera indica* l.): Uma perspectiva para a obtenção de antioxidantes naturais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, p. 640–654, 2012.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium ' s health. **International journal of food science and technology**, v. 36, p. 703–725, 2001.

KELLNER, R. *et al.* **Analytical Chemistry - A Modern Approach to Analytical Science**. 2nd. ed. Weinheim: Wiley, 2004. 1209p.

KEVERS, C. *et al.* Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, p. 8596–603, 2007.

KIM, D.-O. *et al.* Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, p. 3713–7, 2002.

KRUGER, M. J. *et al.* Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. **Food Research International**, v. 59, p. 41–52, 2014.

KUSKOSKI, E. M. *et al.* Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726–732, dez. 2005.

LAJOLO, F. M. Functional foods: Latin American perspectives. **The British journal of nutrition**, v. 88, p. S145–S150, 2002.

LEITE-LEGATTI, A. V. *et al.* Jaboticaba peel: Antioxidant compounds , antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, v. 49, p. 596–603, 2012.

LI, X. *et al.* Optimization of culture conditions for production of yeast biomass using bamboo wastewater by response surface methodology. **Bioresource technology**, v. 100, p. 3613–7, 2009.

LIN, J. *et al.* Effects of roasting temperature and duration on fatty acid composition , phenolic composition, Maillard reaction degree and antioxidant attribute of almond (Prunus dulcis) kernel. **Food Chemistry**, v. 190, p. 520–528, 2016.

LIU, R.-S.; TANG, Y.-J. Tuber melanosporum fermentation medium optimization by Plackett-Burman design coupled with Draper-Lin small composite design and desirability function. **Bioresource technology**, v. 101, p. 3139–46, maio 2010.

LOHMÖLLER, J.-B. **Latent Variable Path Modeling with Partial Least Squares**. 1nd. ed. Heidelberg: Springer, 1989. 286p.

LU, X. *et al.* Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (Allium cepa) and shallot (Allium oschaninii) using infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 129, p. 637–644, 2011.

MAGINA, M. A. *et al.* Atividade antioxidante de três espécies de Eugenia (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, p. 376–382, 2010.

MARTELO-VIDAL, M. J.; VÁZQUEZ, M. Determination of polyphenolic compounds of red wines by UV – VIS – NIR spectroscopy and chemometrics tools. **Food Chemistry**, v. 158, p. 28–34, 2014.

MARTENS, H.; NAES, T. **Multivariate calibration**. New York: Wiley, 1996. 438p.

MILLER, N. J. *et al.* A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical science**, v. 84, p. 407–412, 1993.

NETO, B. DE B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, p. 1401–1406, 2006.

OLIVEIRA, D. D. S. *et al.* Vitamina C, carotenoides, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes da Ceasa do Estado de Minas Gerais. **Acta Scientiarum. Health Science**, v. 33, p. 89–98, 2011.

OLIVEIRA, F. C. C. *et al.* A escolha da faixa espectral no uso combinado de métodos espectroscópicos e quimiométricos. **Química Nova**, v. 27, p. 218–225, 2004.

OYAIZU, M. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics**, v. 44, p. 307–315, 1986.

PARREIRA, T. F. **Utilização de métodos quimiométricos em dados de natureza multivariada**. 106p; (Mestrado em Química). Universidade Estadual de Campinas, 2003.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 198–219, 2003.

PEDRO, A. M. K.; FERREIRA, M. M. C. Nondestructive determination of solids and carotenoids in tomato products by near-infrared spectroscopy and multivariate calibration. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 2505–2511, 2005.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, p. 791–800, 2006.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. **Biometrika**, v. 33, p. 305, 1946.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, p. 4290–302, 2005.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

REIS, C.; ANDRADE, J. DE. Planejamento experimental para misturas usando cromatografia em papel. **Quim. Nova**, v. 19, p. 313–319, 1996.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E. *et al.* Rapid analysis of sugars in fruit juices by FT-NIR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 336, p. 63–74, 2001.

ROHMAN, A.; MAN, Y. B. C. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil. **Food Research International**, v. 43, p. 886–892, 2010.

RUFINO, M. D. S. M. *et al.* Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS. **Comunicado Técnico on line**, v. 128, p. 0–3, 2007a.

_____. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado Técnico on line**, v. 127, p. 0–3, 2007b.

SANCHEZ-MORENO, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, p. 121–137, 2002.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 270, p. 270–276, 1998.

SANTOS, M. H. DOS *et al.* Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café. **Química Nova**, v. 30, p. 604–610, 2007.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 111–125, 2015.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, p. 1–25, 2015.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, p. 213–219, 1993.

SILVA, E. R. DA *et al.* Capacidade antioxidante e composição química de grãos integrais de gergelim creme e preto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 736–742, 2011.

SILVERSTEIN, R. M. *et al.* **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 8th. ed. New York: John Wiley e sons, 2014. 464p.

SINELLI, N. *et al.* Evaluation of quality and nutraceutical content in blueberries (*Vaccinium corymbosum*) by near and mid infrared spectroscopy. **Acta Horticulturae**, v. 810, p. 807–816, 2009.

SOARES, S. E. Ácidos Fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutricao**, v. 15, p. 71–81, 2002.

SOUZA, A. M. DE; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: Um tutorial, parte I. **Quimica Nova**, v. 35, p. 223–229, 2012.

STUART, B. H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. Chichester: Wiley, 2004. 224p.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; IQBAL, S. Effect of different cooking methods on the antioxidant activity of some vegetables from Pakistan. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 560–567, 2008.

TABART, J. *et al.* Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1226–1233, 2009.

TEÓFILO, R. F. **Métodos quimiométricos em estudos eletroquímicos de fenóis sobre filmes de diamante dopado com boro**. 329p. (Doutorado em Química). Universidade Estadual de Campinas, 2007.

TEÓFILO, R. F. .; MARTINS, J. P. A.; FERREIRA, M. M. C. **Study of the computational performance of PLS algorithms using experimental design** (Book of Abstracts of SSC10, Ed.)10th Scandinavian Symposium on Chemometrics (SSC10). **Anais...**Lappeenranta, Finlândia: 2007.

TEÓFILO, R. F.; MARTINS, J. P. A.; FERREIRA, M. M. C. **OPS Toolbox 1.0**. Unicamp, Brasil, INPI - 0000270703255138, 2007.

TODARO, A. *et al.* Recovery of anthocyanins from eggplant peel. **Food Chemistry**, v. 114, p. 434–439, 2009.

TODOROVIC, V. *et al.* Journal of Food Composition and Analysis Polyphenols , methylxanthines , and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia. v. 41, p. 137–143, 2015.

US NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. Vitamin C , Vitamin E , Selenium , and β Carotene and Other Carotenoids : Overview , Antioxidant Definition , and Relationship to Chronic Disease. *In: Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*. Washington: National Academy Press, 2000. p. 35–57; 506p.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Variable selection, outlier detection, and figures of merit estimation in a partial least-squares regression multivariate calibration model. A case study for the determination of quality parameters in the alcohol industry by near-infrared spectroscopy. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, p. 8331–8, 2007.

VALENZUELA, A.; NIETO, S.; UAUY, R. Technological challenges to assess n-3 polyunsaturated fatty acids from marine oils for nutritional and pharmacological use. **Grasas y Aceites**, v. 44, p. 39–46, 1993.

VERSARI, A. *et al.* Prediction of total antioxidant capacity of red wine by Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Control**, v. 21, p. 786–789, 2010.

WICZKOWSKI, W.; SZAWARA-NOWAK, D.; TOPOLSKA, J. Red cabbage anthocyanins: Profile, isolation, identification, and antioxidant activity. **Food Research International journal**, v. 51, p. 303–309, 2013.

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M. Chemometrics, present and future success. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 44, p. 3–14, 1998.

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. **PLS-regression: A basic tool of chemometrics**. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. **Anais...**2001

WU, D. *et al.* Application of near infrared spectroscopy for the rapid determination of antioxidant activity of bamboo leaf extract. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2147–2156, 2012.

XU, L. *et al.* Ensemble preprocessing of near-infrared (NIR) spectra for multivariate calibration. **Analytica Chimica Acta**, v. 616, p. 138–143, 2008.

YAMAGATA, K.; TAGAMI, M.; YAMORI, Y. Dietary polyphenols regulate endothelial function and prevent cardiovascular disease. **Nutrition**, v. 31, p. 28–37, 2015.

ARTIGO I**AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS INTERFERENTES NOS MÉTODOS *in vitro*
DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE ANTOCIANINAS EM EXTRATOS
DE ANTOCIANINAS****EVALUATING SOME POTENTIAL INTERFERENTS IN MEASUREMENTS OF *in vitro*
ANTIOXYDANT CAPACITY OF ANTOCYANIN EXTRACTS**

Isadora R. N. de Oliveira^{a,1}; Reinaldo F. Teófilo^{b,2}; Eduardo B de Oliveira^{a,3}; Afonso M. Ramos^{a,4}; Frederico A. R. de Barros^{a,5}; Mariza de P. Maia^{a,6}; Paulo C. Stringheta^{a,7}

^a Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, s/n. Centro, 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. ^b Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, s/n. Centro, 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. ¹isareboucas@gmail.com; ²rteofilo@gmail.com; ³eduardo.basilio@ufv.br; ⁴amramos@ufv.br; ⁵fredbarros@ufv.br; ⁶marizapmaia@gmail.com; ⁷pstringheta@gmail.com

RESUMO

A avaliação dos efeitos de açúcares, metais, ácidos e outros antioxidantes sobre a estimativa da capacidade antioxidante *in vitro* de extrato de antocianinas purificado por diferentes técnicas foi objetivo deste estudo. Foram avaliados três métodos e suas diferentes formas de expressar o resultado: ABTS_{TEAC} (capacidade equivalente ao trolox, pelo ABTS (2,20-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)), DPPH_{TEAC} (capacidade equivalente ao trolox, pelo DPPH (2,2-difenil-1-picrylhidrazil)), DPPH_{EC50} (redução de 50% do radical, pelo DPPH), DPPH_{%Seq} (redução da capacidade antioxidante, pelo DPPH), FRAP_{TEAC} (capacidade equivalente ao trolox, pelo FRAP (poder de redução do ferro) e FRAP_{EC50} (redução de 50% do radical, pelo FRAP). A forma de expressão do resultado em EC50, para DPPH e FRAP, foram as que mais apresentaram interferência nos resultados, principalmente quando aplicados em meio contendo ácido tartárico e ácido ascórbico. O método que mais mostrou coerência foi o ABTS_{TEAC}, pois apresentou interferência apenas do ácido ascórbico. Este método não foi afetado significativamente pelos demais interferentes adicionados à solução de antocianinas. Entretanto, o ácido ascórbico mostrou ser um poderoso interferente em todos os casos, devendo, pois, ser removido do meio antes de se executar quantificações *in vitro* de capacidade antioxidante de antocianinas em materiais alimentares.

Palavras chaves: Capacidade antioxidante, radicais livres, compostos bioativos.

1 INTRODUÇÃO

O consumo regular de polifenóis, incluindo flavonóides (ex.: antocianinas), ácidos fenólicos e taninos, têm sido associados a determinados benefícios à saúde, como a inibição da acumulação de colesterol sanguíneo, redução do risco de doenças coronarianas, prevenção de alguns tipos de câncer e diabetes, para citar apenas alguns exemplos (Hollman, 2014; Kruger *et al.*, 2014; Lachman e Hamouz, 2005; Teresa, 2014; Yamagata, Tagami e Yamori, 2015). Em particular, as antocianinas têm sido estudadas e utilizadas não apenas pelos possíveis benefícios à saúde, mas também devido sua aplicabilidade como corantes em alimentos, bem como pela sua contribuição na inibição da oxidação lipídica (Zhang *et al.*, 2013).

Os ensaios para avaliação da capacidade antioxidante (CA) *in vitro* são simples, controláveis, possuem baixo custo comparado com ensaios biológicos (*in vivo*), considerando ainda que poupam a utilização de animais de experimentação. Vale ressaltar que um composto que apresente baixas CA *in vitro* dificilmente apresentará alta CA *in vivo*. Os métodos para avaliação *in vitro* da CA de materiais alimentares propostos na literatura são diversos. Contudo, em situações específicas, alguns podem ser mais apropriados que outros, de acordo com a natureza dos compostos presentes na amostra analisada. Assim, podem ocorrer divergências nos resultados quando se compara a CA *in vitro* de um dado material aplicando diferentes técnicas. Isso ocorre porque cada método é baseado em mecanismos físico-químicos distintos, que podem ser mais ou menos influenciados pela presença de outros compostos comumente encontrados em alimentos, como, açúcares, vitaminas e aminoácidos (Shahidi e Zhong, 2015; Tabart *et al.*, 2009). Os métodos de para avaliação *in vitro* da CA envolvem desde ensaios químicos mais simples à ensaios mais complexos utilizando diversas técnicas instrumentais (Sanchez-Moreno, 2002; Schaich, Tian e Xie, 2015). Entre os métodos mais frequentemente relatados na literatura, têm-se as determinações empregando o radical ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)) e os ensaios com o radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrylhidrazil). Embora estes ensaios sejam geralmente classificados como reações de transferência simples de elétrons (SET), estes dois radicais podem ser estabilizados por redução direta via transferência de elétrons ou por extinção radical através da transferência de prótons (Jiménez *et al.*, 2004; Schaich, Tian e Xie, 2015).

Padrões e mecanismos de reatividade são difíceis de interpretar, se não estiverem disponíveis informações detalhadas sobre a composição do meio e as estruturas

moleculares dos antioxidantes que estão sendo testados. A reatividade é afetada pela presença de moléculas pequenas, tais como o ácido ascórbico e ácido úrico, devido ao acessibilidade molecular, que apresentariam maior CA quando comparadas a moléculas maiores, como os compostos fenólicos (Prior, Wu e Schaich, 2005; Tan e Lim, 2015).

Como há diferentes espécies químicas que podem originar radicais livres, não se pode afirmar que haja um método simples e universal para determinar a CA com exatidão em todos os materiais alimentares. Por conseguinte, para se ter uma avaliação mais exata da CA de uma determinada substância, é necessário saber como e quais radicais são gerados (Alves *et al.*, 2010). Para contornar essa limitação, preconiza-se a utilização de diferentes métodos, pois nenhum método usado isoladamente refletirá a “capacidade antioxidante total” de uma amostra (Huang, Ou e Prior, 2005; Prior, Wu e Schaich, 2005). Tabart *et al.* (2009) propuseram expressar os resultados da CA através da média ponderada de quatro métodos, sendo a média simples não adequada, pois alguns métodos apresentam altos valores, o que levaria a superestimar certos compostos.

Neste contexto, o presente estudo objetivou realizar uma avaliação comparativa de métodos clássicos de determinação da CA *in vitro* (ABTS, DPPH, FRAP) com vistas a discutir a adequação desses métodos à análise de extratos de antocianinas purificadas provenientes de diferentes fontes alimentícias, além de determinar a interferência de algumas espécies químicas nos resultados dessas análises.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Extração, purificação e quantificação de antocianinas

Para obtenção do extrato de antocianinas utilizado como substrato no presente trabalho, foram utilizadas diversas fontes vegetais. As antocianinas predominantes em cada uma dessas fontes estão listadas na Tabela 1.

As matérias primas foram adquiridas em estabelecimentos comerciais locais, na cidade de Viçosa, zona da Mata do estado de Minas Gerais, Brasil (Latitude: -20° 45' 14" e Longitude: -42° 52' 55", e 648 m acima do nível do mar, referenciado por apolo11); exceto a uva violeta que foi doada pela Estação Experimental de Viticultura Tropical da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), na cidade de Jales, noroeste do estado de São Paulo, Brasil (Latitude: -20° 16' 08" e Longitude: -50° 32' 45", e 476 m acima do nível do mar, referenciado por apolo11) e a polpa de açaí, que foi obtida de

Belém, no estado do Pará (Latitude: -1° 27' 21" e Longitude: -48° 30' 16", e 10 m acima do nível do mar, referenciado por apolo11). As amostras foram encaminhadas ao laboratório e armazenadas a -80 °C até o momento da extração.

Tabela 1 – Fontes utilizadas e suas respectivas antocianinas majoritárias

Fonte	Antocianinas majoritárias	Referência
Bananeira (<i>Musa paradisiaca</i> L)	Antocianidina 3-glicosídeos (Cianidina-3-rutinosídeo)	(Pazmiño-Durán <i>et al.</i> , 2001)
Casca de berinjela (<i>Solanum melongena</i>)	Delfinidina-3-rutinosídeo	(Todaro <i>et al.</i> , 2009)
Casca de jaboticaba (<i>Myrciaria jaboticaba</i>)	Delfinidina 3-glucosídeo; Cianidina 3-glicosídeo	(Leite-Legatti <i>et al.</i> , 2012)
Cascas de uva violeta (<i>Vitis labrusca</i> , var <i>BRS</i> <i>Violeta</i>).	Antocianidina 3,5-diglicosídeos (delfinidina, petunidina e malvidina)	(Rebello <i>et al.</i> , 2013)
Morango (<i>Fragaria ssp</i>)	Perlagonidina-3-glicosídeo	(Silva <i>et al.</i> , 2007)
Polpa de açaí (<i>Euterpe oleracea</i> Martins)	Cianidina-3 –rutinosídeo; Cianidina-3 –glicosídeo	(Rosso, de <i>et al.</i> , 2008)
Repolho roxo (<i>Brassica oleraceae</i>)	Cianidina-3,5-diglicosídeo	(Wiczowski, Szawara- nowak e Topolska, 2013)

A extração foi executada utilizando-se solução etanólica 70% v/v a pH = 2 (com HCl diluído). As misturas foram mantidas em agitação *overnight*, à temperatura de 8 ± 2 °C e ao abrigo de luz. Em seguida, as misturas foram filtradas e, partindo-se do filtrado, o solvente eliminado em evaporador rotativo (MA 120, Marconi).

O resíduo da evaporação (extrato com antocianinas) foi ressuscitado em água e submetida ao processo de purificação em cartucho C18 (Sep-Pak Vac 35cc – Waters). A purificação visou à remoção de interferentes, tais como açúcares, aminoácidos, proantocianinas e outros, resultado apenas nas antocianinas. A purificação seguiu o método descrito por Rodriguez-Saona & Wrolstad (2001). Inicialmente o cartucho foi condicionado com 50 mL de metanol acidificado (0,01 % de HCl) e 50 ml de água destilada. Posteriormente, uma alíquota do extrato aquoso (20 ml) foi eluída no cartucho de separação. Os interferentes foram removidos por meio da passagem de 100 ml de água destilada e 50 ml de acetato de etila. As antocianinas purificadas foram eluídas com metanol. O solvente foi eliminado em evaporador rotativo (MA 120, Marconi) e o resíduo da evaporação (extrato com antocianinas purificadas) ressuscitado em água (20 ml).

Após a purificação, partes iguais de cada extrato foram misturadas para obtenção do *pool* de antocianinas (contendo os vários tipos de antocianinas). A quantificação no *pool* de antocianinas seguiu o método proposto por Fuleki e Francis (1968) utilizando o solvente

etanol: HCl 1,5 mol·L⁻¹ (85:15) para diluição das amostras e calibração do espectrofotômetro (UV-1601 PC Shimadzu). As amostras foram submetidas a leitura espectrofotométrica a 535 nm e o teor de antocianinas totais obtido pela Equação 1.

$$C' = \frac{A \times FD}{\epsilon \times b} \quad \text{Eq. 01}$$

em que: A = Absorbância (ABS) em 535 nm; ϵ = Coeficiente de absorvidade de cianidinas (98,2); C' = Concentração de antocianina (mg·L⁻¹), expressa em cianidina-3-glicosídeo (g·L⁻¹); b = espessura da cubeta (1 cm); FD = Fator de diluição do extrato.

2.2 Efeito de potenciais interferentes sobre a capacidade antioxidante *in vitro* do extrato de antocianinas purificado

No extrato de antocianinas purificado obtido conforme o item 2.1 foram adicionadas diferentes espécies químicas (em concentrações variadas) que podem interferir nos resultados da CA *in vitro*, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Concentrações pré-definidas das diferentes espécies químicas avaliadas na determinação da capacidade antioxidante (CA) *in vitro*.

Classe do composto	Composto estudado	Valor (-1)	Valor (+1)
Antioxidantes	Ácido ascórbico (AA)	3,30 mg/100g ^a	1.100,54 mg/100g ^b
	Ácido gálico (AG)	0,39 mg/100g ^c	1,18 mg/100g ^d
	Antocianinas (At)	5,55 mg/100g ^e	641,01 mg/100g ^f
Açúcar redutor	Frutose (Fru)	0,1 g/100g ^g	8,2 g/100g ^h
	Glicose (Gli)	0,1 g/100g ^g	7,2 g/100g ^h
Ácidos orgânicos	Ácido Tartárico (Tar)	3,68 mg/100g ⁱ	32,72 mg/100g ^j
	Ácido málico (Mal)	34,89 mg/100g ⁱ	418,65 mg/100g ^k
Minerais	Magnésio (Mg)	3,35 mg/100 mL ^l	159,59 mg/100g ⁿ
	Potássio (K)	24,60 mg/100 mL ^m	598,36 mg/100g ⁿ
Aminoácidos	Cisteína (Cis)	0,01g/100g ^o	0,02g/100g ^t
	Triptofano (Trp)	0,01g/100g ^p	0,02g/100g ^s
	Tirosina (Tir)	0,04g/100g ^q	0,06g/100g ^t

Concentração referente às seguintes fontes e autores: (Sousa *et al.*, 2007): Graviola^a; (Ribeiro, 2012): camu-camu^b; (Rampazzo, Takikawa e Haminiuk, 2012): amora^c; morango^d; (Teixeira, Stringheta e Oliveira, 2008): Romã^e; Jabuticaba^f; (Scherer, Rybka e Godoy, 2008): Beterraba^g; uvas^h; açaíⁱ; cajuí^j; acerola^k; (Morgano, Queiroz e Ferreira, 1999): suco de goiaba^l; suco de uva^m; (Gondim *et al.*, 2005): casca de tangerinaⁿ, (TACO, 2011): mamão^o; repolho^p; alface^q; banana^r; manga^s; alho poró^t.

2.2.1 Efeito dos ácidos gálico e ascórbico

Nesta etapa, avaliou-se o efeito sobre a capacidade antioxidante do extrato antociânico quando estão presentes no meio dois outros compostos que também têm ação antioxidante, os ácidos gálico e ascórbico. Foi utilizado o planejamento de mistura simplex-centroid aumentado (MSCD), considerando a concentração intermediária preestabelecida. Foram consideradas as variáveis x_1 = ácido ascórbico, x_2 = ácido gálico

e x_3 = antocianinas, estudando-as puras e em misturas binárias e terciárias. Os ensaios foram aleatorizados (Tabela 3) e os experimentos realizados em duplicata.

Tabela 3 – Variáveis utilizadas no planejamento de mistura simplex-centroid (MSCD).

Ensaio	Ácido ascórbico (mL)	Ácido gálico (mL)	Antocianinas (mL)
8	66,70	16,70	16,70
7	33,33	33,33	33,33
2	0,00	100,00	0,00
3	0,00	0,00	100,00
6	0,00	50,00	50,00
4	50,00	50,00	0,00
1	100,00	0,00	0,00
10	16,67	16,67	66,67
5	50,00	0,00	50,00
9	16,67	66,67	16,67
C* (mg·100 mL)	552	0,80	324

* concentração intermediária usada nas misturas (baseado nos limites +1 e -1 da Tabela 2).

Modelos de regressão múltiplas (linear (Eq. 2a) e quadrático (Eq. 2b)) foram utilizados para interpretação dos dados.

$$Y = \beta'_1 x'_1 + \beta'_2 x'_2 + \beta'_3 x'_3 \quad \text{Eq.: 2a}$$

$$Y = \beta'_1 x'_1 + \beta'_2 x'_2 + \beta'_3 x'_3 + \beta'_1 \beta'_2 x'_1 x'_2 + \beta'_1 \beta'_3 x'_1 x'_3 + \beta'_2 \beta'_3 x'_2 x'_3 \quad \text{Eq.: 2b}$$

onde Y representa a função resposta dos dados experimentais para cada método de CA; x_1 , x_2 e x_3 são as variáveis independentes e correspondem à porcentagem de ácido ascórbico, ácido gálico e antocianinas, respectivamente, e β são os coeficientes estimados.

Os modelos foram avaliados usando a ANOVA: para aqueles que não apresentaram falta de ajuste foi construída a superfície de resposta. Os cálculos e gráficos foram executados pelo software Statistica 7[®] (V. 7.0, Statsoft Copyringht, Inc.).

2.2.2 Efeito de outros antioxidantes, açúcares redutores, ácidos orgânicos, minerais e aminoácidos

Nesta etapa, foi avaliado o efeito de diferentes misturas de compostos frequentemente presentes em matrizes alimentares de origem vegetal (Tabela 2), incluindo antioxidantes (ácido gálico e ascórbico), açúcares redutores (frutose e glicose), ácidos orgânicos (ácidos tartárico e málico), minerais (magnésio e potássio) e aminoácido redutores (cisteína, triptofano e tirosina). Aplicou-se o planejamento de Plackett-Burman (PBD), com a finalidade de identificar nas misturas os principais componentes que influenciam a capacidade antioxidante *in vitro*. Este planejamento é utilizado como triagem multifatorial rápida para encontrar os fatores independentes mais significativos,

não considerando o efeito das interações (Álvarez-Casas *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2009; Plackett e Burman, 1946). Os fatores foram avaliados por meio do ajuste de uma equação polinomial de primeira ordem. Cada fator foi testado em níveis de baixa (-1) e alta concentração (+1). Quinze variáveis (incluindo três variáveis *Dummys*) foram selecionados em 16 ensaios experimentais. O PBD (Tabela 1, material suplementar) foi desenvolvido utilizando o software Statistica 7[®] (V. 7.0, Statsoft Copyringht, Inc.) e realizado em duas repetições. A fim de facilitar a visualização dos fatores importantes, um diagrama de Pareto padronizado foi utilizado, estipulando $\alpha = 0,05$.

2.3 Ensaios *in vitro* de capacidade antioxidante

Para todas as misturas apresentadas na seção 2.2, foram realizados ensaios *in vitro* de avaliação da CA por três diferentes métodos, conforme descrito nas seções subsequentes. O antioxidante padrão utilizado em todas as determinações TEAC foi o antioxidante sintético trolox nas concentrações de 20 a 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

2.3.1 DPPH

Foi empregada a medida da capacidade sequestraste de radicais DPPH[•], descrita por Pukalskas *et al.* (2002) e Brand-Williams, Cuvelier, & Berset (1995) com modificações. A Solução de 2,2-difenil-1-picril hidrazina (DPPH) foi preparada a uma concentração de 0,1 mM e mantida no escuro entre as análises. Para que não ocorresse variação no preparo dessa solução, o controle da concentração foi realizado através da correção da absorbância, adotando-se a absorvidade molar (ϵ) de 12509 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Brand-Williams, Cuvelier e Berset, 1995).

O radical DPPH[•] a 0,1mM (3,5mL) foi adicionado a amostra (0,5mL), sendo vigorosamente agitada em vortex (Phoenix Luferco, AP56), mantendo-se em repouso por 30 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A absorbância foi medida a 517 nm utilizando um espectrofotômetro (UV-1601 PC, Shimatzu). A leitura do branco (álcool etílico 80%) e das soluções padrões seguiram o mesmo procedimento da amostra.

A capacidade sequestrante do radical DPPH (DPPH_{%Seq}) nas soluções foi calculada pela Equação 3:

$$\% \text{ sequestrante} = 1 - \frac{\text{DPPH}_{30'}}{\text{DPPH}_B} \times 100 \quad \text{Eq.: 3}$$

em que DPPH_{30'} = absorbância após 30 minutos de reação; DPPH_B = absorbância do branco.

A EC50 foi calculada utilizando como base as proporções necessárias para determinar a concentração que ocasionava a redução de 50% do DPPH•. Reagiu-se o radical DPPH• com amostras em diferentes concentrações, obtendo-se um gráfico de ABS vs concentração de amostra (Brand-Williams, Cuvelier e Berset, 1995). Através da equação da reta foi obtido a EC50, para o método com o DPPH (DPPH_{EC50}).

O coeficiente da capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC) foi obtido após plotagem das absorvâncias (517nm) em função das concentrações conhecidas das soluções trolox (Re *et al.*, 1999). O DPPH_{TEAC} foi expresso em $\mu\text{M Trolox}\cdot\text{mL}^{-1}$.

2.3.2 ABTS

A determinação da capacidade antioxidante com o radical catiônico ABTS^{•+} (2,20-azino-bis (3-etilbenzotiazolina) foi realizada baseado no método descrito por Re *et al.*, (1999). Soluções contendo ABTS^{•+} foram preparadas misturando-se soluções de 7 mM do reagente ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio (1:1; v/v). A mistura foi mantida ao abrigo da luz, a 50 °C, por 15 minutos e, em seguida, diluída em etanol (80%) até atingir uma absorvância a 734 nm igual a 0,700 ($\pm 0,05$).

As amostras (0,5mL) foram misturadas ao ABTS^{•+} (3,5mL), sendo vigorosamente agitadas em vortex (Phoenix Lufenco, AP56) e mantidas no escuro por 6 min, sendo as medidas de absorvâncias realizadas a 734 nm (espectrofotômetro UV-1601 PC Shimadzu). As mesmas condições foram empregadas com as soluções padrão de trolox.

O coeficiente da capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC) foi obtido após plotagem das absorvâncias (734nm) em função das concentrações conhecidas das soluções trolox (Re *et al.*, 1999). O ABTS_{TEAC} foi expresso em $\mu\text{M Trolox}\cdot\text{mL}^{-1}$.

2.3.3 FRAP

O método FRAP foi realizado segundo Oyaizu (1986), citado por Yen, Chen, & Science (1995). Amostras (1mL) foram misturadas a 1 mL de solução tampão fosfato pH 6,6 e 1,5 mL de solução de ferrocianeto de potássio 1% (m/v). As misturas resultantes foram incubadas a 50 °C por 30 minutos. Decorrido esse tempo, adicionou-se 1,5 mL de ácido tricloroacético a 10% (m/v), e, em seguida, centrifugou-se (Fanem, Excelsa II 206MP) a 5000g por 10min. Uma alíquota de 2,0 mL do sobrenadante foi coletada e a ela misturou-se 2,0 mL de água destilada e 0,5 mL de solução de cloreto de ferro a 0,1% (m/v). Essa mistura foi agitada vigorosamente em vortex (Phoenix Lufenco, AP56) em

então mediu-se a absorvância a 700 nm (espectrofotômetro UV-1601 PC Shimadzu). A análise do branco (água destilada) e do padrão (trolox) seguiu o mesmo procedimento.

A EC50 foi calculada utilizando como base as proporções necessárias para encontrar uma absorvância de 0,500, através da equação da reta das amostras em diferentes diluições (FRAP_{EC50}). O coeficiente da capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC) foi obtido após plotagem das absorvâncias (700 nm) em função das concentrações conhecidas das soluções trolox (Re *et al.*, 1999), sendo o resultado (FRAP_{TEAC}) expresso em $\mu\text{M trolox}\cdot\text{mL}^{-1}$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito dos ácidos gálico e ascórbico sobre a capacidade antioxidante *in vitro* do extrato de antocianinas

Na Tabela 4 estão resumidamente apresentados os dados dos modelos ajustados. Todos os fatores lineares que foram significativos ($p < 0,05$) influenciaram positivamente a capacidade antioxidante. Pelo efeito positivo, observa-se que a medida que se aumentou a concentração dos fatores (antocianinas, ácido gálico e ácido ascórbico), a capacidade antioxidante também foi aumentada.

Tabela 4 – Coeficiente dos modelos para cada metodologia e método de expressão do resultado da capacidade antioxidante *in vitro*.

Método e expressão do resultado	Fator	Coeficiente	Erro	t(17)	P
(**)ABTS _{TEAC}	AA	14,05	1,21	11,65	0,00
	AG	-0,27	1,20	-0,22	0,83
	Antocianinas	65,27	1,20	54,28	0,00
DPPH _{TEAC}	AA	17,79	1,11	15,97	0,00
	AG	-0,48	1,11	-0,43	0,67
	Antocianinas	54,67	1,11	49,19	0,00
(**) DPPH _{%Seq} *	AA	80,23	3,41	23,51	0,00
	AG	3,26	3,40	0,96	0,35
	Antocianinas	89,38	3,40	26,30	0,00
	AA*AG	-21,67	15,69	-1,38	0,19
	AA *Antocianinas	25,87	15,69	1,65	0,12
	AG * Antocianinas	154,74	15,67	9,88	0,00
DPPH _{EC50}	AA	22,27	57,15	0,39	0,70
	AG	771,03	56,91	13,55	0,00
	Antocianinas	20,50	56,91	0,36	0,72
	AA*AG	-1572,92	262,80	-5,99	0,00
	AA *Antocianinas	185,73	262,80	0,71	0,49
	AG * Antocianinas	-1615,02	262,36	-6,16	0,00
FRAP _{EC50}	AA	53,10	143,61	0,37	0,72
	AG	1917,09	143,01	13,40	0,00
	Antocianinas	48,10	143,01	0,34	0,74
	AA*AG	-3950,38	660,37	-5,98	0,00
	AA *Antocianinas	469,25	660,37	0,71	0,49
	AG * Antocianinas	-4011,88	659,27	-6,09	0,00
(**)FRAP _{TEAC}	AA	28,75	2,88	9,99	0,00
	AG	-1,16	2,87	-0,40	0,69
	Antocianinas	118,20	2,87	41,19	0,00

* Amostra diluída 100X. AA= Ácido ascórbico. AG = Ácido gálico. **Negrito:** significativo ao nível de significância de 0,05. **Métodos que apresentaram falta de ajuste não significativa a $\alpha=0,05$ (Tabela 2, material suplementar)

Dentre os métodos utilizados e as diferentes formas de expressão dos resultados, ABTS_{TEAC}, DPPH_{%seq} e FRAP_{TEAC} apresentaram modelos com falta de ajuste não significativa (Tabela 2, material suplementar). Para tais métodos uma discussão é apresentada a seguir. Os métodos com falta de ajuste não significativa foram influenciados pela presença de ácido ascórbico e de antocianinas no meio, sendo o efeito dessas últimas mais pronunciado que o do ácido ascórbico. Uma possível explicação para isso estaria nas diferenças de estrutura molecular e de propriedades químicas dos compostos. As antocianinas possuem anéis aromáticos e hidroxilas fenólicas, o que lhes confere a propriedade de estabilizar, por ressonância, elétrons desemparelhados de radicais livres, o que se traduz como uma capacidade antioxidante mais pronunciada. Cao, Sofic, & Prior, (1997) e Rice-Evans, Miller, & Paganga, (1996) reportaram que a

diferença entre a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos são correlacionadas à estrutura molecular específica de cada composto (número de grupos OH fenólicos e tipos de cadeia lateral ligada aos anéis aromáticos). Uma maior proporção de OH fenólicos livres geralmente se correlaciona com uma maior capacidade antioxidante do composto. Já o ácido ascórbico reage facilmente com o O₂ do meio, reduzindo a disponibilidade deste para outras reações de oxidação, onde já se mostrou *in vitro* que a capacidade antioxidante dos flavonoides (grupo ao qual pertencem as antocianinas) é maior que a da vitaminas C (Rice-Evans, Miller e Paganga, 1996). O ácido gálico potencializou o efeito antioxidante das antocianinas, representado pelo efeito significativo da interação entre esses dois compostos, quando utilizando DPPH%Seq. Este resultado mostra que o ácido gálico apresenta maior efeito quando antocianinas estão presentes.

Todos os modelos foram significativos, porém alguns apresentaram falta de ajuste significativa a $\alpha = 0,05$ (Tabela 2, material suplementar). Os modelos que não apresentaram falta de ajuste ($p > 0,05$) podem ser considerados preditivos e, para estes, os gráficos de contorno foram gerados (Figura 1).

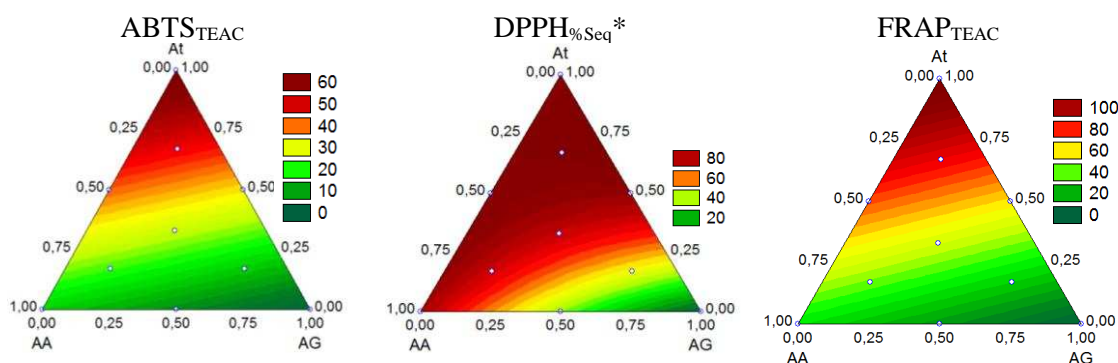


Figura 1 – Diagrama de contorno para cada metodologia que apresentou falta de ajuste não significativa. At= Antocianinas. AA = Ácido ascórbico. AG = Ácido gálico. Modelos lineares= ABTS_{TEAC} e FRAP_{TEAC}. Modelo quadrático = DPPH%Seq (*Amostra diluída 100X)

A análise dos gráficos mostra que o fator com maior influência foi a concentração de antocianinas. A contribuição isolada desse fator (vértices superiores) apresentou os mais altos valores na capacidade antioxidante segundo todos os três métodos. Além disso, é possível notar que quando se aumenta a concentração do ácido gálico (vértices inferiores direitos), a capacidade antioxidante avaliada pelos três métodos apresentou tendência a valores mínimos. Para os antioxidantes isolados o que menos contribuiu com a capacidade antioxidante foi o ácido gálico, isso provavelmente deve-se a concentração

utilizada (concentração média encontrada naturalmente nos vegetais é baixa) e também a sua estrutura, que pode apresentar ação pró-oxidante (Alves et al., 2010).

Os resultados de correlação entre os valores de capacidade antioxidante *in vitro*, avaliada e expressa segundo as diferentes técnicas aplicadas no presente estudo, são dados na Tabela 5. Métodos com alta correlação podem ser utilizados indistintamente, sem prejudicar a interpretação dos resultados, pois trazem informações semelhantes.

Tabela 5 – Correlação entre os diferentes métodos de capacidade antioxidante *in vitro*.

Método e expressão do resultado	ABTS _{TEAC}	FRAP _{TEAC}	DPPH _{TEAC}	DPPH _{%Seq}	DPPH _{EC50}	FRAP _{EC50}
ABTS _{TEAC}	-	0,99	0,99	0,78	-0,47	-0,47
FRAP _{TEAC}		-	0,99	0,79	-0,48	-0,48
DPPH _{TEAC}			-	0,82	-0,52	-0,52
DPPH _{%Seq}				-	-0,79	-0,79
DPPH _{EC50}					-	1,00
FRAP _{EC50}						-

Esses resultados indicam que os resultados expressos em EC50, pelo DPPH e FRAP, foram os que apresentam a mais alta correlação (1,00), já quando estes foram comparados com TEAC apresentaram baixas correlações ($\leq -0,52$). Apesar dos resultados entre a expressão em EC50 apresentarem boa correlação (Tabela 4), eles apresentaram falta de ajuste significativa (Tabela 2, material suplementar), não sendo, pois, indicados para explicar a variação da capacidade antioxidante do extrato de antocianinas analisado.

Os resultados expressos em TEAC apresentaram alta correlação (0,99). Altas correlações entre esses métodos ABTS e DPPH já foram relatadas na literatura e a tendência é que o ensaio com o radical DPPH[•] proporcione valores médios mais baixos em relação ao ABTS (Kevers *et al.*, 2007; Tabart *et al.*, 2009). O fato de ambas as reações terem mecanismos similares (transferência simples de elétrons – SET) pode ser a explicação para a alta correlação entre os seus resultados (Prior, Wu e Schaich, 2005). Além da elevada correlação (0,99) apresentada pelos métodos ABTS_{TEAC} e FRAP_{TEAC} estes métodos apresentaram falta de ajuste não significativa ($p > 0,05$), explicando bem a variação dos dados.

O método DPPH_{%Seq} apresentou falta de ajuste não significativa ($p > 0,05$), podendo assim, explicar bem a variação dos dados, porém sua utilização em substituição aos demais métodos apresentados neste estudo, precisa ser avaliada, em razão da correlação verificada ($\leq 0,80$). Outro inconveniente desse método é a necessidade de se

informar a diluição aplicada à amostra durante as análises, dado nem sempre relatado nos artigos, o que inviabiliza a comparação de dados experimentais com aqueles da literatura.

3.2 Efeito de açúcares redutores, ácidos orgânicos, minerais e aminoácidos sobre a capacidade antioxidante *in vitro* do extrato antociânico

Através do PBD foi possível identificar, dentre vários compostos (açúcares redutores, ácidos orgânicos, minerais, aminoácidos e outros agentes com ação antioxidante) normalmente encontrados em matrizes alimentares, que influenciaram de forma mais pronunciada os valores de capacidade antioxidante avaliada por meio das diferentes metodologias *in vitro*. Nos gráficos de Pareto (Figura 2), os efeitos padronizados estão representados na ordem de magnitude absoluta; a vertical tracejada indica o limite de significância ($\alpha=0,05$).

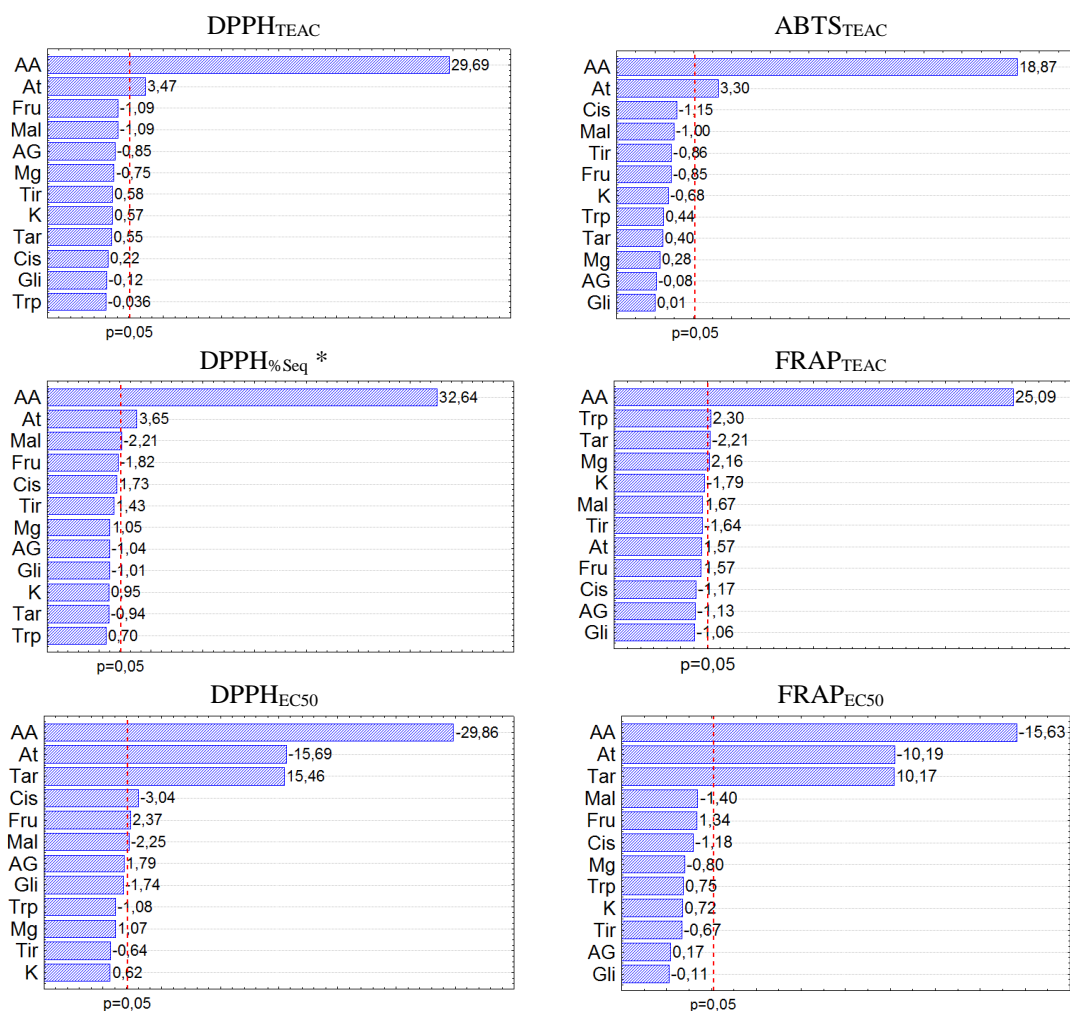


Figura 2 – Gráficos de Pareto dos efeitos estimados do delineamento Plackett-Barnman. AA = ácido ascórbico, AG= ácido gálico; At = antocianinas; Fru= frutose; Gli=glucose; Tar=ácido tartárico; Mal=ácido málico; Mg=magnésio; K=potássio; Cis= cisteína; Trp=triptofano; Tir=tirosina. *Amostra diluída 250X.

As variáveis mais significativas foram o ácido ascórbico e antocianinas, pois influenciaram os resultados de todos os métodos de análise, exceto os resultados do FRAP_{TEAC} (não influenciado pelas antocianinas). Isso pode ser resultado de o ácido ascórbico apresentar grande poder de redução e gerar novas espécies redutoras na presença de Fe³⁺. Essas novas espécies redutoras podem ter causado maior redução do complexo Fe³⁺/ferricianeto (princípio do método do FRAP), resultando assim em uma maior atividade, demonstrando um maior efeito do ácido ascórbico quando comparado com as antocianinas presentes no meio.

Os resultados obtidos via método FRAP foi influenciado por diversos dos fatores estudados (ácido ascórbico, ácido tartárico, triptofano, magnésio e potássio). Uma explicação possível para os efeitos do magnésio e do potássio (resultados superestimados) é a menor eletronegatividade desses elementos comparada à do ferro, ou seja, eles têm maior facilidade em ceder elétrons. Assim sendo, sua presença pode favorecer a redução do ferro, que é o mecanismo em que se baseia esse método de análise. Diante desse resultado, para análise *in vitro* da capacidade antioxidante de materiais contendo antocianinas e ricos em magnésio e potássio, não se sugere preconizar o método FRAP.

Ao se utilizar um antioxidante como padrão para expressão dos resultados (TEAC), utilizando o método ABTS ou DPPH, observou-se efeito significativo apenas das antocianinas e do ácido ascórbico. O ácido gálico, apesar de ser um polifenol, não aumentou significativamente a capacidade antioxidante dos extratos de antocianinas, segundo os resultados dos métodos de ABTS_{TEAC} e DPPH_{TEAC}, isso pode ter sido resultado da baixa concentração utilizada nos ensaios, sendo estas as concentrações naturalmente encontradas.

Os resultados obtidos com o método do DPPH, expressos em termos de EC₅₀, foram significativamente afetados pelos fatores açúcares, ácidos orgânicos e o aminoácido cisteína. Desta maneira, antes de aplicar essa metodologia, é recomendável a remoção desses potenciais interferentes, principalmente o ácido tartárico, que foi o composto não antioxidante que apresentou maior influência. Isso pode ser atribuído à modificação do pH, pois já é sabido que variações do pH levam a variações nos resultados usando DPPH (Ozcelik, Lee e Min, 2003), ressaltando-se que a influência do pH sobre as propriedades antioxidantes dos compostos ainda não está totalmente elucidada (Dawidowicz, Wianowska e Olszowy, 2012). Outros autores relataram que o método do DPPH para medir CA apresenta inconvenientes por ser afetado por muitos interferentes,

tai como metais e açúcares (Dawidowicz, Wianowska e Olszowy, 2012; Prior, Wu e Schaich, 2005).

Normalmente o PBD é utilizado como triagem multifatorial inicial, sendo necessário posteriormente realizar experimentos adicionais para melhor explicar a variação do efeito observado em função da variação dos fatores considerados. Porém, no presente trabalho, apenas a simples observação do efeito já é conclusiva, uma vez que o ideal seria que os métodos empregados fornecessem resultados não influenciados pela presença de outros compostos não antioxidantes.

Globalmente, os resultados desse estudo sugerem que: *i*) é indicado a utilização dos métodos (ABTS_{TEAC} e DPPH_{TEAC}) que possuem menos influência dos interferentes estudados; *ii*) é recomendado, antes de realizar os ensaios de CA *in vitro*, a inclusão de uma etapa preliminar nos protocolos experimentais visando à remoção dos compostos que provavelmente mais interferem nos resultados da metodologia a ser utilizada.

4 CONCLUSÃO

A determinação da CA de antocianinas por DPPH_{%Seq} pode ser utilizada, porém deve-se remover ácidos orgânicos (e/ou controlar o pH do meio) e indicar a diluição utilizada (dado que pode dificultar a comparação com a literatura, pois é um dado quase sempre omitido nos trabalhos publicados).

O método DPPH_{EC50} foi o que apresentou maior influência dos interferentes (cisteína, frutose, glicose, ácido málico e tartárico) e ao trabalhar apenas com compostos antioxidantes, o método apresentou falta de ajuste, sendo este o método menos indicado.

O método FRAP não é indicado para CA dos compostos estudados pois apresenta muito interferentes (ácido ascórbico, ácido tartárico, triptofano, Mg e K). Para sua utilização tais interferentes devem ser removidos, e os resultados expressos em TEAC, por ser um método (FRAP_{TEAC}) que não apresentou falta de ajuste.

No entanto, se se desejar apresentar a capacidade antioxidante responsável apenas pela antocianina é necessário a remoção do ácido ascórbico, que apresenta uma alta contribuição na capacidade antioxidante em todos os métodos estudados.

Os métodos ABTS_{TEAC} e DPPH_{TEAC} apresentaram influência apenas dos agentes antioxidantes, sendo o ABTS_{TEAC} o que apresentou melhor desempenho por não ter apresentado falta de ajuste.

5 REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ-CASAS, M. *et al.* Effect of experimental parameters in the pressurized solvent extraction of polyphenolic compounds from white grape marc. **Food chemistry**, v. 157, p. 524–32, 2014.
- ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202–2210, 2010.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25–30, 1995.
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, p. 749–760, 1997.
- DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D.; OLSZOWY, M. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH Å method (Problems in estimation of antioxidant activity). **Food chemistry**, v. 131, p. 1037–1043, 2012.
- FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanins in cranberries. **Journal of Food Science**, v. 33, p. 72–77, 1968.
- GONDIM, J. A. M. *et al.* Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 825–827, 2005.
- HOLLMAN, P. C. H. Unravelling of the health effects of polyphenols is a complex puzzle complicated by metabolism. **Archives of Biochemistry and Biophysics** **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 559, p. 100–105, 2014.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, p. 1841–56, 2005.
- JIMÉNEZ, A. *et al.* Reducing activity of polyphenols with stable radicals of the TTM series. Electron transfer versus H-abstraction reactions in flavan-3-ols. **Organic letters**, v. 6, p. 4583–6, 2004.
- KEVERS, C. *et al.* Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, p. 8596–603, 2007.
- KRUGER, M. J. *et al.* Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. **Food Research International**, v. 59, p. 41–52, 2014.
- LACHMAN, J.; HAMOUZ, K. Red and purple coloured potatoes as a significant antioxidant source in human nutrition - A review. **Plant, Soil and Environment**, v. 51, p. 477–482, 2005.

LEITE-LEGATTI, A. V. *et al.* Jaboticaba peel: Antioxidant compounds , antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, v. 49, p. 596–603, 2012.

LI, X. *et al.* Optimization of culture conditions for production of yeast biomass using bamboo wastewater by response surface methodology. **Bioresource technology**, v. 100, p. 3613–7, 2009.

MORGANO, M. A.; QUEIROZ, S. C. DO N.; FERREIRA, M. M. C. Determinação dos teores de minerais em sucos de frutas por espectrometria de emissão óptica em plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, p. 344–348, 1999.

OZCELIK, B.; LEE, J. H.; MIN, D. B. Effects of Light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 487–490, 2003.

PAZMIÑO-DURÁN, E. A. *et al.* Anthocyanins from banana bracts (*Musa X paradisiaca*) as potential food colorants. **Food Chemistry**, v. 73, p. 327–332, 2001.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. **Biometrika**, v. 33, p. 305, 1946.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, p. 4290–302, 2005.

PUKALSKAS, A. *et al.* Identification of Radical Scavengers in Sweet Grass (*Hierochloe odorata*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2914–2919, 2002.

RAMPAZZO, V.; TAKIKAWA, A. Y.; HAMINIUK, C. W. I. **Quantificação de compostos fenólicos em frutas vermelhas (*Fragaria vesca* , *Rubus idaeus* , *Morus nigra*)** Seminário de extensão e inovação,. **Anais...**Curitiba, PR: 2012

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

REBELLO, G. *et al.* Phenolic composition of the berry parts of hybrid grape cultivar BRS Violeta (BRS Rubra × IAC 1398-21) using HPLC – DAD – ESI-MS / MS. **Food Research International journal**, v. 54, p. 354–366, 2013.

RIBEIRO, P. F. DE A. **Compostos bioativos de camu-camu (*Myrciaria dubia*) em função do ambiente de cultivo e do estágio de maturação**. 128p. (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, 2012.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 933–956, jan. 1996.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; WROLSTAD, R. E. Extraction, Isolation, and Purification of Anthocyanins. *In: WROLSTAD, R. E. et al. (Eds.). . Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Methods in Molecular Biology. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001. v. 864.

ROSSO, V. V. DE *et al.* Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC .) and açaí (*Euterpe oleracea* Mart .) by HPLC – PDA – MS / MS. **Journal of food composition and analysis**, v. 21, p. 291–299, 2008.

SANCHEZ-MORENO, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, p. 121–137, 2002.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 111–125, 2015.

SCHERER, R.; RYBKA, A. C. P.; GODOY, H. T. Determinação simultânea dos ácidos orgânicos tartárico, málico, ascórbico e cítrico em polpas de acerola, açaí e caju e avaliação da estabilidade em sucos de caju. **Química Nova**, v. 31, p. 1137–1140, 2008.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, p. 1–25, 2015.

SILVA, F. L. DA *et al.* Anthocyanin pigments in strawberry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, p. 374–382, 2007.

SOUSA, P. H. M. *et al.* **Correlação entre a atividade antioxidante e os conteúdos de vitamina C e fenólicos totais em frutas tropicais do nordeste brasileiro** XLVII Congresso Brasileiro **Anais...**Natal, RN: 2007

TABART, J. *et al.* Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1226–1233, 2009.

TACO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4a. ed. Campinas, SP: NEPA - Núcleo de estudos e pesquisas em alimentação, 2011.

TAN, J. B. L.; LIM, Y. Y. Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. **Food chemistry**, v. 172, p. 814–822, 2015.

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A. DE. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**, v. 55, p. 297–304, 2008.

TERESA, S. D. P. Molecular mechanisms involved in the cardiovascular and neuroprotective effects of anthocyanins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 559, p. 68–74, 2014.

TODARO, A. *et al.* Recovery of anthocyanins from eggplant peel. **Food Chemistry**, v. 114, p. 434–439, 2009.

WICZKOWSKI, W.; SZAWARA-NOWAK, D.; TOPOLSKA, J. Red cabbage anthocyanins: Profile, isolation, identification, and antioxidant activity. **Food Research International journal**, v. 51, p. 303–309, 2013.

YAMAGATA, K.; TAGAMI, M.; YAMORI, Y. Dietary polyphenols regulate endothelial function and prevent cardiovascular disease. **Nutrition**, v. 31, p. 28–37, 2015.

YEN, G.; CHEN, H. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 27–32, 1995.

ZHANG, X. *et al.* Comparison of the activities of hydrophilic anthocyanins and lipophilic tocopherols in black rice bran against lipid oxidation. **Food chemistry**, v. 141, p. 111–6, 2013.

ARTIGO II

DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE ANTOCIANINAS, POLIFENÓIS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE REPOLHO ROXO (*Brassica Oleracea*) POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

RESUMO

O desenvolvimento de um método para a determinação de antocianinas totais e monoméricas, polifenóis totais e capacidade antioxidante em extrato de repolho roxo (*Brassica Oleracea*) empregando espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR), infravermelho médio (MID) e quadrados mínimos parciais (PLS) foi o objetivo deste trabalho. Extratos de repolho roxo obtido com solução etanólica 70% (v/v) foram concentrado até 9 °Brix e diluídos em proporções de 5 a 100 % em água para determinação das propriedades: antocianinas totais e monoméricas, polifenóis totais e a capacidade antioxidante. Espectros NIR (10000 a 4000 cm^{-1}) empregando absorvância e MID (4000 a 650 cm^{-1}) empregando refletância total atenuada (ATR) foram obtidos a partir das mesmas amostras. Os extratos apresentaram antocianina total de 21,95–595,72 mg L^{-1} , antocianina monomérica de 23,08 – 588,24 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, polifenóis totais de 42,94 – 1073,39 mg L^{-1} , e a capacidade antioxidante pelo método ABTS e DPPH variou de 0,20 – 5,90 e 0,23 – 4,90 $\mu\text{M trolox}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Aplicou-se a regressão PLS1 aliada ao método de seleção dos preditores ordenados (OPS). Foi aplicada também a regressão simultânea de todas as propriedades (PLS-2). Os modelos PLS-OPS apresentaram os melhores resultados de predição com coeficientes de correlação (r_c) $>0,99$, relação de desempenho do desvio (RPD) $>5,80$ e erro médio relativo (%E) $< 10\%$. Os espectros NIR forneceram os melhores modelos para antocianinas monoméricas e capacidade antioxidante, pelo ABTS e DPPH, com erro médio quadrático de previsão (RMSEP) de 32,23, 0,21 e 0,13, respectivamente; já os espectros MID foram mais preditivos para antocianinas totais e polifenóis totais, com RMSEP de 14,31 e 34,62, respectivamente. O método apresentado mostrou-se simples, exato e rápido para determinar a qualidade de extrato de repolho roxo utilizado nas indústrias de alimentos.

Palavras chaves: compostos fenólicos, ABTS e DPPH.

1 INTRODUÇÃO

As antocianinas pertencem à classe dos compostos fenólicos e apresentam a característica de fornecer cor, que varia desde o azul ao vermelho. Uma variedade de vegetais produz estes compostos que são consumidos pelos seres humanos, sendo o consumo regular associados a determinados benefícios à saúde, como a inibição da acumulação de colesterol sanguíneo, redução do risco de doenças coronarianas, prevenção de alguns tipos de câncer e diabetes, entre outros benefícios (Hollman, 2014; Kruger *et al.*, 2014; Lachman e Hamouz, 2005; Teresa, 2014; Yamagata, Tagami e Yamori, 2015).

Atualmente, além da ocorrência natural, as antocianinas podem ser encontradas em alimentos industrializados, uma vez que a indústria de alimentos tem utilizado extratos vegetais para conferir cor aos alimentos e aumentar o interesse do consumidor por produtos “mais saudáveis”. Dentre as diversas fontes de antocianinas, destacam-se a uva e o repolho roxo, que são empregados comercialmente como fonte desse pigmento (Constant, 2003; Teixeira, Stringheta e Oliveira, 2008). Na indústria de alimentos, o repolho roxo apresenta vantagem comercial por ser uma fonte de menor custo quando comparado à uva (Teixeira, Stringheta e Oliveira, 2008).

Não há limite máximo para adição de antocianinas como corante em alimentos (BRASIL, 2001), sendo estes comercializados na forma de extratos concentrados, em pó ou soluções (Hamerski, Rezende e Silva, 2013). A composição e concentração dos extratos vegetais são variáveis, sendo de grande importância a caracterização e quantificação dos compostos presentes, uma vez que é necessária para correta utilização e padronização dos alimentos.

As análises convencionais para a determinação dos compostos bioativos utilizam métodos que consomem muito tempo e utilizam diversos reagentes químicos, como álcool, metanol, acetona, Folin–Ciocalteu, trolox, radicais ABTS (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato) e DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazina), entre outros (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). Por outro lado, os métodos que empregam a técnica de espectroscopia no infravermelho associada a métodos de regressão multivariada fornecem resultados rápidos e exatos (Pasquini, 2003; Xu *et al.*, 2008), além de ser um método não destrutivo, sem consumo de reagentes e que não geram resíduos (Montes *et al.*, 2013; Pasquini, 2003).

Diante disto, é crescente o interesse por parte de muitos grupos de pesquisa e indústria pela aplicação da espectroscopia vibracional aliada à regressão multivariada para realizar análises quantitativas. Muitos trabalhos já vêm sendo realizados nesta área em diversas amostras alimentares e na determinação de várias propriedades: Sinelli *et al.* (2009) determinou antocianinas, flavonoides, polifenóis e ácido ascórbico em mirtilos; Dykes *et al.* (2014) analisou o teor de polifenóis totais, taninos condensados e antocianinas em sorgo; Wu *et al.*, (2012) quantificou a capacidade antioxidante em extrato de bambu; Dong, Ni e Kokot (2014) trabalhou com menta avaliando polissacarídeos, polifenóis totais, flavonoides e capacidade antioxidante; entre outros.

Todavia, não foi encontrado trabalho que tenha construído modelos de regressão multivariada a partir de espectros obtidos de diluições de extrato vegetais para quantificar todas as propriedades estudadas neste trabalho. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi propor um método simples e rápido para determinação de antocianinas, polifenóis totais e capacidade antioxidante no extrato de repolho roxo usando a espectroscopia do infravermelho próximo (NIR) e distante (MID) aliadas à regressão PLS.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do extrato e análises de referência

Amostras de repolho roxo (*Brassica oleracea*) foram adquiridas em estabelecimentos comerciais, na cidade de Viçosa, zona da Mata do estado de Minas Gerais, Brasil (Latitude: -20° 45' 14" e Longitude: -42° 52' 55", e 648 m acima do nível do mar, referenciado por apolo11) entre outubro de 2013 e outubro de 2014.

As amostras foram encaminhadas ao laboratório e a extração realizada imediatamente após a aquisição das amostras. O material foi triturado em solução etanólica 70% (v/v) em volume suficiente para cobrir o material sólido. A mistura foi acidificada com HCl 1,5 mol·L⁻¹ até pH 2 e deixada em repouso em ausência de luz por 24 h a 7 °C ± 1 °C. Após 24 h as amostras foram filtradas a vácuo em papel Whatman nº 1. O solvente do extrato foi removido até a concentração de 9 °Brix em evaporador rotativo (MA 120, Marconi), sendo os extratos misturados e mantidos sob congelamento (-18° C) até o momento da análise. Antes das análises foram realizadas 38 diluições seriadas, contendo de 5 – 100 % do extrato em água destilada.

Um segundo conjunto de amostras de repolho roxo foi obtido no mês de abril de 2015, a fim de obter amostragem representativa dos extratos de repolho. O processo de extração foi realizado imediatamente após a coleta seguindo o protocolo descrito para o primeiro conjunto. Neste segundo momento foram realizadas 11 diluições seriadas, contendo de 5 – 100 % do extrato. Os dois conjuntos (extrato concentrado e diluições) totalizaram 49 amostras.

As análises de antocianinas totais, antocianinas monoméricas, polifenóis totais e capacidade antioxidante (pelos radicais ABTS e DPPH) foram realizadas no extrato concentrado e nas suas diluições conforme descritos nos itens a seguir. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

2.1.1 Antocianinas totais

O teor de antocianinas totais foi determinado pelo método de Fuleki e Francis (1968) utilizando o solvente etanol: HCl 1,5 mol·L⁻¹ (85:15) para diluição das amostras e calibração do espectrofotômetro (UV-1601 PC Shimadzu). As amostras foram submetidas a leitura espectrofotométrica a 535 nm e o teor de antocianinas totais obtido pela Equação 1.

$$C' = \frac{A \times FD}{\epsilon \times b} \quad \text{Eq. 01}$$

em que: A = Absorbância (ABS) em 535 nm; ϵ = Coeficiente de absorvidade de cianidinas (98,2); C' = Concentração de antocianina (mg·L⁻¹), expressa em cianidina-3-glicosídeo (g·L⁻¹); b = espessura da cubeta (1 cm); FD = Fator de diluição do extrato.

2.1.2 Antocianinas monoméricas

A determinação das antocianinas monoméricas foi obtida pelo método de pH diferencial (Giusti e Wrolstad, 2001). As amostras foram diluídas em tampão de cloreto de potássio a 0,025 mol·L⁻¹ (pH 1) e em tampão acetato de sódio, 0,4 mol·L⁻¹ (pH 4,5). Realizou-se a leitura a 510 nm e 700 nm em espectrofotômetro (UV-1601 PC Shimadzu) calibrado com água destilada. A absorbância geral (A) das diluições foi obtida pela Equação 2:

$$A = (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1,0} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4,5} \quad \text{Eq. 02}$$

A concentração das antocianinas monoméricas foi encontrada pela Equação 3:

$$\text{Antocianinas monoméricas (mg·L}^{-1}\text{)} = (A \times PM \times FD \times 1000) / (\epsilon \times 1) \quad \text{Eq. 03}$$

em que: $PM = 449,2$ (cianidina-3-glucósido); $FD =$ fator de diluição do extrato para leitura; $\varepsilon = 26900$ (cianidina-3-glucósido em tampão pH 1).

2.1.3 Polifenóis totais

Para a eliminação dos interferentes dos compostos fenólicos, as amostras foram eluídas em cartucho de separação C18 (Sep-Pak Vac 35cc – Waters), para remoção dos interferentes da análise (ácido ascórbico, açúcares e aminoácidos) (Noratto, *et al.*, 2010). Inicialmente o cartucho foi condicionado com 50 mL de metanol acidificado (0,01 % de HCl) e 50 mL de água destilada. Posteriormente, uma alíquota de 20 mL do extrato aquoso foi eluída no cartucho de separação. Os interferentes foram removidos por meio da passagem de 100 mL de água destilada pelo cartucho, ficando os polifenóis adsorvidos. O extrato polifenólico livre de interferentes foi eluído do cartucho com 50 mL de metanol (Noratto *et al.*, 2010). O metanol foi eliminado em evaporador rotativo (MA 120, Marconi) e a amostra redissolvida em água destilada.

O teor de fenólicos totais nos extratos foi estimado utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu, de acordo com o método proposto por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999). A absorbância em 760 nm foi lida em espectrofotômetro (UV-1601 PC Shimadzu) contra o branco. Uma curva padrão de ácido gálico foi utilizada para expressar os resultados em Equivalentes de Ácido Gálico (AGE) e o valor final expresso em mg AGE (ácido gálico equivalente) por litro de amostra.

2.1.4 Capacidade antioxidante

A determinação da capacidade antioxidante foi avaliada pelo ensaio TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao trolox) com o radical ABTS (Re *et al.*, 1999) e DPPH (Kim *et al.*, 2002 com modificações). O antioxidante padrão utilizado foi o antioxidante sintético trolox nas concentrações de 20 a 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e o resultado expresso em $\mu\text{M Trolox}\cdot\text{mL}^{-1}$.

O cátion $\text{ABTS}^{+\bullet}$ (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato) foi formado a partir da mistura das soluções aquosas de 7 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de ABTS e 2,45 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de persulfato de potássio (1:1), incubada à 50 °C e na ausência de luz, por 15min. Transcorrido esse tempo, a solução foi diluída em etanol 80% até se obter uma solução com absorbância de 0,700 ($\pm 0,05$), a 734 nm (espectrofotômetro UV-1601 PC Shimadzu). O DPPH \bullet (2,2-difenil-1-picril hidrazina) foi preparado a uma concentração de 0,1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, em etanol 80%, usando a ABS para correção da concentração.

O espectrofotômetro foi calibrado com solução etanólica 80%. Para a reação foi utilizado 0,5 mL da amostra e 3,5 mL do radical, sendo o tempo da reação com o radical ABTS⁺• de 6 min (Re *et al.*, 1999) e com o DPPH• de 30 min (após determinação de cinética). A leitura após as reações com ABTS⁺• foi realizada a 734 nm e com o DPPH• a 517 nm em espectrofotômetro (UV-1601 PC Shimadzu). Para construção da curva padrão (trolox) e o branco (etanol 80%) seguiu-se o mesmo procedimento da amostra.

2.2 Obtenção dos espectros infravermelho e tratamento quimiométrico dos dados.

Os espectros NIR e MID foram adquiridos imediatamente após a realização das análises de referência. Dois espectros de cada amostra foram obtidos com 32 varreduras cada, usando o *software* do instrumento. Para ambos os espectros, o branco foi realizado com água destilada no início e a cada 10 leituras para evitar deslocamento excessivo da linha de base e remover a informação da água.

As leituras na região do infravermelho próximo (NIR) foram realizadas em um espectrômetro com transformada de Fourier, modelo Varian 660-IR, com acessório para cubeta no modo transmitância. Aplicou-se o logaritmo do inverso da transmitância para obter a absorbância, que foi usada para construir os modelos. Uma alíquota do extrato, sem tratamentos prévios, foi adicionada à cubeta de quartzo com caminho óptico de 5 mm. A faixa investigada foi de 10000 a 4000 cm⁻¹ com incremento de 4 cm⁻¹.

A coleta dos espectros do infravermelho médio (MID) foi realizada em espectrômetro Thermo Scientific, Nicolet 6700 FT-IR, com acessório de refletância total atenuada (ATR), com compartimento da amostra em cristal de germânio. Uma alíquota apropriada da amostra, sem tratamentos prévios, foi adicionada sobre o acessório ATR. A faixa investigada foi de 4000 a 650 cm⁻¹.

2.2.1 Calibração multivariada

O método de regressão por quadrados mínimos parciais (PLS) foi utilizado para construir os modelos de calibração. Na tentativa de minimizar os efeitos causados por variações aleatórias ou sistemáticas indesejáveis de diferentes origens, foram empregadas técnicas de pré-tratamentos matemáticos nos espectros, antes da construção do modelo, para que estas variações não tivessem influência nos resultados finais.

Os espectros originais foram alisados para aumentar a relação S/R, os espectros NIR tiveram a linha de base corrigida e os espectros MID foram transformados pela aplicação da primeira derivada.

As amostras foram divididas em dois grupos. Sendo 15% das amostras (15 amostras) separadas para previsão externa. A validação cruzada com amostragem aleatória foi utilizada para a escolha do número de variáveis latentes (nVL).

As propriedades dos extratos calibradas foram: antocianinas totais, antocianinas monoméricas, polifenóis totais e capacidade antioxidante (ABTS e DPPH). Deste modo, além da regressão para cada propriedade (PLS-1), realizou-se a regressão simultânea para todas as propriedades (PLS-2).

Para identificação de amostras anômalas, os valores de *leverage*, conhecido também como poder de alavancagem, e resíduos de Student foram calculados conforme Equações 11 e 12 do referencial teórico, respectivamente.

A validação externa foi realizada e os modelos preditivos, considerando menor erro quadrático médio de previsão (RMSEP) e maior coeficiente de correlação (r), foram escolhidos conforme Equações 13 e 14 do referencial teórico.

Para indicar a qualidade dos modelos, a relação de desempenho do desvio (RPD) foi calculada conforme Equação 15 (do referencial teórico). Embora o método PLS funcione bem para um grande número de variáveis, o algoritmo da seleção dos preditores ordenados (OPS) foi aplicado para selecionar as variáveis mais importante para o modelo (Teófilo, Martins e Ferreira, 2007). Após a construção dos modelos, estes foram testados quanto a sua predição, estabilidade e correlação verdadeira.

Os cálculos foram realizados pelo PLS_Toolbox 6.5 (Eigenvector Research, Inc., USA) para Matlab, Matlab 7.0 (The MathWorks, Co., USA) e o pacote de algoritmos, OPS_Toolbox (Teófilo, Martins e Ferreira, 2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra a estatística descritiva (valores mínimos e máximos, média e desvio padrão) dos parâmetros químicos avaliados nos extratos de repolho roxo, determinada pelo método referência.

Tabela 1 – Estatística descritiva das propriedades dos extratos de repolho roxo

Propriedades	AT	AM	POLI	ABTS	DPPH
Valor mín.	21,95	23,08	42,94	0,20	0,23
Valor máx.	595,72	588,24	1073,39	5,90	4,90
Média	308,75	285,11	562,06	2,30	2,37
Desvio padrão	159,31	145,26	275,82	1,25	1,23

AT: Antocianinas Totais ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); AM: Antocianinas Monoméricas ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); POLI: Polifenóis totais (mg de ácido gálico equivalente $\cdot\text{L}^{-1}$); ABTS: $\text{TEAC}_{\text{ABTS}}$ (μM trolox $\cdot\text{mL}^{-1}$); DPPH: $\text{TEAC}_{\text{DPPH}}$ (μM trolox $\cdot\text{mL}^{-1}$).

Uma faixa relativamente ampla da composição nos parâmetros químicos foi observada devido às diferentes diluições utilizadas, visando atingir toda a gama de extratos futuros. A composição antioxidante no repolho roxo já foi avaliada por outros autores (Pliszka *et al.*, 2009; Volden *et al.*, 2008; Wiczowski, Szawara-nowak e Topolska, 2013).

Os espectros originais obtidos para as amostras de extratos de repolho pelo NIR e MID podem ser observados na Figura 1a e 1d, respectivamente, bem como as transformações realizadas em cada espectro (Figura 1).

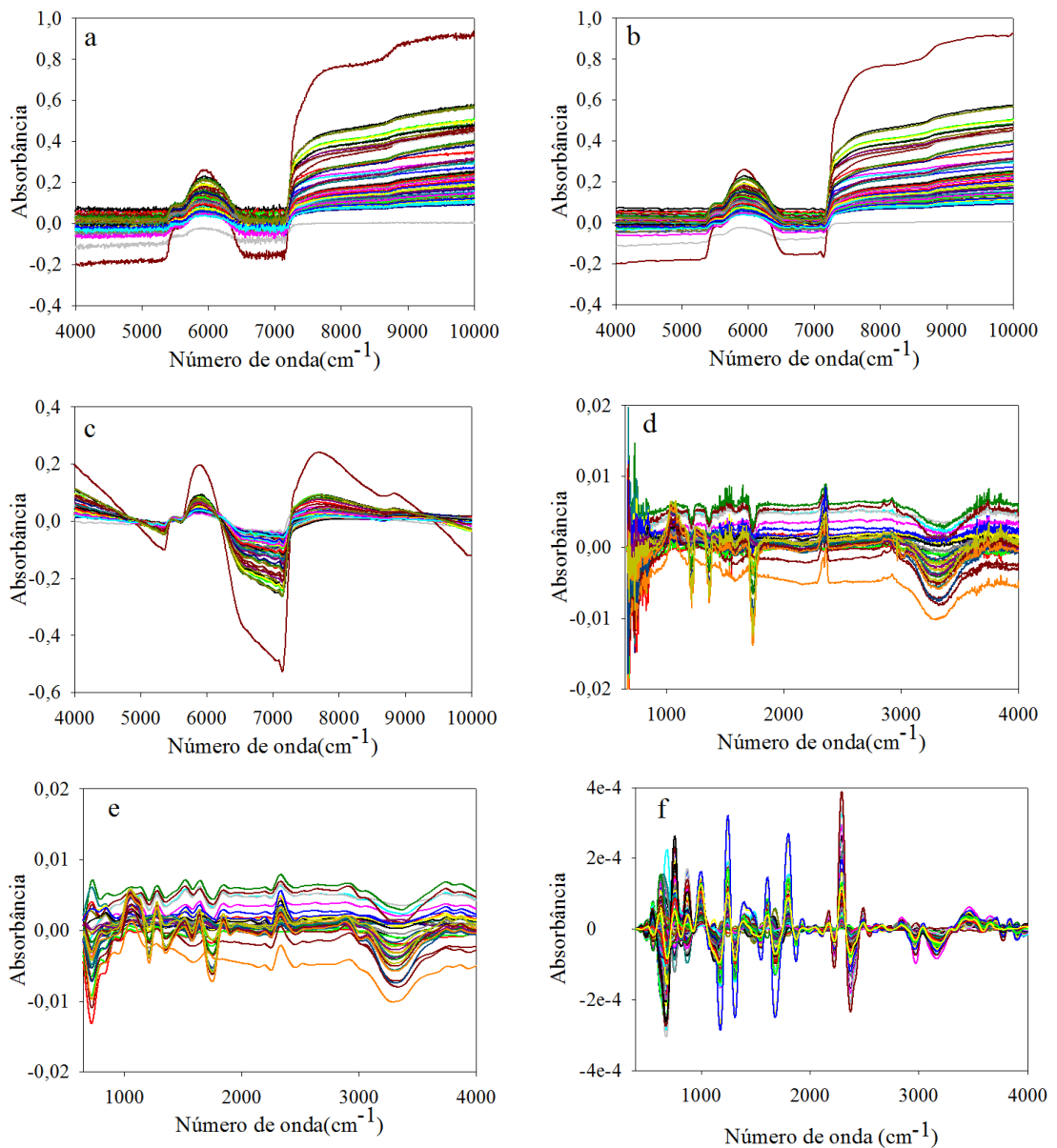


Figura 1 – Espectros na região do infravermelho para extratos de repolho roxo. a) espectros NIR originais; b) espectros NIR alisados; c) espectros NIR alisados e com correção da linha de base (*baseline*); d) espectros MID originais; e) espectros MID alisados; f) espectros MID alisados e com primeira derivada (Savitzky Golay janela 15).

Os espectros (Figura 1a e 1d) foram bastante homogêneos, porém apresentaram ruído e deslocamento da linha de base, evidenciando que os pré-tratamentos matemáticos são essenciais para reduzir a interferência de variações físicas indesejadas e aumentar a relação sinal/ruído.

Ruídos e comportamento sistemático são características indesejáveis nos espectros (Pedro e Ferreira, 2005). Nas Figuras 1a e 1d observa-se que os espectros apresentam ruído e deslocamento da linha de base. Diante disto, os espectros NIR e MID originais foram inicialmente transformados pelo alisamento *wavelet* (Misiti *et al.*, 2015) (Figura 1b e 1e) para suavizar os ruídos. Os espectros NIR recebeu uma transformação empregando o algoritmo *baseline* (Wise *et al.*, 2006) para corrigir deslocamentos da linha de base (Figura 1c). A linha de base dos espectros MID foi corrigida aplicando-se a primeira derivada pelo Savitsky Golay (Savitzky e Golay, 1964), com janela 15 (Figura 1f). Pode-se observar que o alisamento aplicado (Figura 1b e 1e) não eliminou qualquer característica importante dos espectros, e assim, toda a informação química relevante foi mantida para a construção do modelo. O alisamento melhora a relação sinal/ruído, enquanto a correção da linha de base e a primeira derivada eliminam deslocamentos constantes indesejáveis. Estas transformações foram escolhidas pois foram as que resultaram nos menores valores de RMSECV e maiores valores de r e RPD para os modelos PLS-1 construídos.

Para a construção do modelo, amostras que apresentaram *leverage* e/ou resíduos de Student elevados foram considerados amostras anômalas (*outliers*). A Figura 2 representa um exemplo de amostras com este tipo de comportamento.

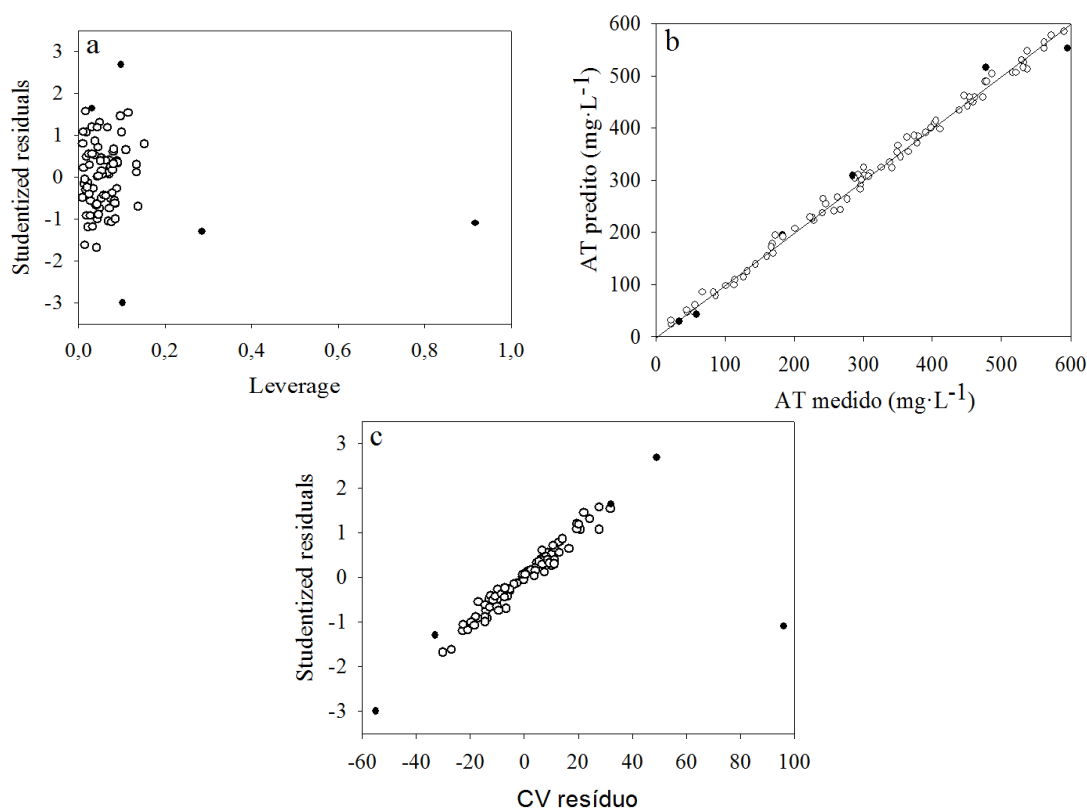


Figura 2 – Representação gráfica do modelo de predição para antocianinas totais. a) Gráfico de leverage versus resíduos de Student; b) medido vs. preditos; c) resíduos da validação cruzada vs. resíduos de Student. As amostras em destaque foram consideradas outliers

As amostras em destaque (●) estão com alto *leverage* e/ou alto resíduo de Student (Figura 2a), as amostras com alto resíduo de Student (Figura 2a) apresentaram distância na linearidade ao se comparar os valores medidos vs preditos (Figura 2b), sendo removidas do modelo. As amostras com alto resíduo de Student também apresentaram elevado resíduo na validação cruzada (Figura 2c). Esses mesmos parâmetros foram utilizados na remoção dos *outliers* das demais propriedades.

Três modelos foram construídos com os dados centrados na média e transformados conforme mostrado na Figura 1: (1) modelo PLS-2 para as propriedades simultaneamente e com todas as variáveis; (2) modelo PLS-1 para cada propriedade e com todas as variáveis; (3) modelo PLS-1 para cada propriedade e com variáveis selecionadas pelo método OPS.

Os resultados dos modelos PLS-1 e PLS-2 utilizando dados espectrais de NIR e MID para a predição quantitativa das propriedades do extrato de repolho roxo são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros de ajuste dos modelos PLS-1 e PLS-2

Modelos com espectros NIR																
PLS-1																
Propriedades	PLS-1		Sem seleção de variáveis					Com seleção de variáveis (OPS)					PLS-2 (nVL= 5 e out=4)*			
	nVL	out	RMSECV	RMSEP	r _v	r _p	RPD	RMSECV	RMSEP	r _v	r _p	RPD	RMSECV	RMSEP	r _v	r _p
AT	6	5	13,23	27,91	0,9963	0,9907	11,7	10,82	23,28	0,9975	0,9940	14,33	16,76	32,95	0,9942	0,9870
AM	6	5	19,4	29,82	0,9911	0,9881	7,52	13,84	46,49	0,9955	0,9692	10,57	26,28	38,35	0,9823	0,9806
Polifenóis	5	6	43,23	70,52	0,9879	0,9799	6,42	33,4	86,29	0,9928	0,9676	8,33	49,75	63,35	0,9825	0,9850
ABTS	7	6	0,22	0,28	0,9831	0,9925	5,41	0,17	0,30	0,9894	0,9908	6,86	0,32	0,69	0,9624	0,9456
DPPH	5	6	0,17	0,14	0,9905	0,9974	7,22	0,13	0,15	0,9945	0,9965	9,57	0,21	0,26	0,9852	0,9936

Modelos com espectros MID																
PLS-1																
Propriedades	PLS-1		Sem seleção de variáveis					Com seleção de variáveis (OPS)					PLS-2 (nVL= 6 e out=6)*			
	nVL	out	RMSECV	RMSEP	r _v	r _p	RPD	RMSECV	RMSEP	r _v	r _p	RPD	RMSECV	RMSEP	r _v	r _p
AT	10	7	14,18	20,35	0,9960	0,9950	11,22	12,46	18,24	0,9969	0,9964	12,78	27,18	29,53	0,9852	0,9884
AM	6	5	18,44	26,89	0,9918	0,9900	7,81	14,99	26,16	0,9946	0,9909	9,69	27,96	29,02	0,9810	0,9887
Polifenóis	6	6	42,17	50,21	0,9886	0,9890	6,61	31,75	41,36	0,9936	0,9924	8,84	52,11	53,7	0,9820	0,9877
ABTS	9	5	0,19	0,36	0,9866	0,9898	6,13	0,17	0,33	0,9891	0,9920	6,79	0,33	0,44	0,9631	0,9813
DPPH	6	5	0,16	0,19	0,9902	0,9918	7,12	0,14	0,14	0,9928	0,9958	8,38	0,21	0,22	0,9849	0,9891

nVL: número de variáveis latentes; out: *Outliers*; RMSEP: erro quadrático da previsão; RMSECV: erro quadrático médio de validação; r_v = correlação da validação cruzada; r_p= correlação da previsão; RPD: relação de desempenho do desvio. AT: Antocianinas Totais (mg·L⁻¹); AM: Antocianinas Monoméricas (mg·L⁻¹); POLI: Polifenóis totais (mg de ácido gálico equivalente·L⁻¹); ABTS:TEAC_{ABTS} (μM trolox·mL⁻¹); DPPH: TEAC_{DPPH} (μM trolox·mL⁻¹). * Variáveis latentes e *Outliers* para o modelo PLS2.

Comparando os modelos com espectros NIR, observa-se que os modelos construídos com o PLS-2 apresentaram os maiores erros quando comparado com os modelos PLS-1 (com ou sem seleção de variáveis), exceto a predição de polifenóis, apresentou um menor RMSEP com o modelo PLS-2. Para os modelos com espectros MID os melhores foram com seleção (PLS-OPS). Isto mostra que os modelos com a regressão por PLS-1 apresentaram, em geral, melhor desempenho que os modelos PLS-2, porém, o método PLS-2 tem a vantagem de modelar todas as propriedades simultaneamente, gerando um único modelo para prever todas as propriedades.

O fato do modelo PLS-2 ter apresentado menor desempenho é provavelmente resultado das técnicas utilizadas na construção da modelagem: Onde para o PLS-1 são removidos *outliers* específicos de cada propriedade, ajustando melhor o modelo; já no PLS-2 são removidas as mesmas amostras em todas as propriedades modeladas, o que pode resultar na permanência de alguns *outliers* para algumas das amostras. Outro aspecto importante é que no PLS-2 não é possível executar algoritmo OPS de seleção de variáveis.

Como os resultados apresentados indicam que os modelos PLS-1 são melhores para realizar previsões que o PLS-2, os modelos com PLS-1 foram escolhidos. Nota-se que a seleção de variáveis empregando o algoritmo OPS melhorou significativamente os modelos PLS-1 dos espectros MID.

Os modelos PLS-OPS construídos com os espectros MID apresentaram os menores erros de previsão (RMSEP). Para algumas propriedades, os modelos construídos com os espectros NIR ao aplicar a seleção de variáveis OPS, apresentaram maiores erros de predição (RMSEP), isto é devido as amostras de baixa concentração presentes no modelo, que resultaram em elevados erros.

Os erros relativos médios (%E) modelos PLS-OPS foram maiores que 10%, mostrando que não são confiáveis para predição. Ao analisar os erros relativos das amostras de previsão, observou-se que as amostras de baixa concentração apresentaram erros muito elevados (>200%), mostrando que tais modelos não se aplicam às baixas concentrações. Isto não é uma desvantagem, uma vez que os extratos utilizados nas indústrias normalmente são concentrados. Dykes *et al.* (2014) também relatou baixa precisão nas amostras de baixas concentrações ao trabalhar com sorgo, medindo taninos condensados e antocianinas, os quais pertencem ao grupo dos compostos fenólicos. Diante disto, novos modelos foram construídos, removendo-se as amostras de baixa concentração, e os novos parâmetros encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros de ajuste dos modelos sem as amostras de baixa concentração, para os espectros NIR e MID

Modelos com espectros NIR									
Propriedades			Completo (<i>Var</i> =1557)			PLS-OPS			
	<i>nVL</i>	out	RMSECV	RMSEP	RPD	<i>nVars</i>	RMSECV	RMSEP	RPD
AT	6	3	14,82	19,43	9,54	320	10,58	20,12	13,41
AM	5	2	20,72	33,11	6,33	420	16,37	32,23	8,10
Poli	5	6	40,28	49,97	6,26	320	27,18	52,69	9,25
ABTS	5	2	0,23	0,22	4,66	410	0,19	0,21	5,84
DPPH	5	4	0,16	0,16	6,83	250	0,13	0,16	8,22

Modelos com espectros MID									
Propriedades			Completo (<i>Var</i> =1869)			PLS-OPS			
	<i>nVL</i>	out	RMSECV	RMSEP	RPD	<i>nVars</i>	RMSECV	RMSEP	RPD
AT	11	2	15,51	15,28	9,29	690	14,03	14,31	10,26
AM	9	5	18,33	44,66	7,15	520	12,80	37,62	10,26
Poli	10	5	42,29	33,63	5,93	565	32,85	34,62	7,64
ABTS	10	3	0,22	0,22	5,33	805	0,16	0,23	7,22
DPPH	6	5	0,16	0,16	6,36	200	0,12	0,21	8,43

Faixa da modelagem					
Propriedades	AT	AM	POLI	ABTS	DPPH
	101 – 596	86 – 599	189 – 1140	0,73 – 5,90	0,85 – 4,90

PLS-OPS: Modelos construídos por regressão de quadrados mínimos parciais, aliados a seleção de variáveis; *nVL*: número de variáveis latentes; out: *Outliers*; RMSECV: erro quadrático médio de validação; RMSEP: erro quadrático da previsão; RPD: relação de desempenho do desvio; *Var*: Variáveis utilizadas na construção do modelo completo; *nVars*: número de variáveis selecionadas pelo OPS. AT: Antocianinas Totais ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); AM: Antocianinas Monoméricas ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); POLI: Polifenóis totais (mg de ácido gálico equivalente $\cdot\text{L}^{-1}$); ABTS: $\text{TEAC}_{\text{ABTS}}$ ($\mu\text{M trolox}\cdot\text{mL}^{-1}$); DPPH: $\text{TEAC}_{\text{DPPH}}$ ($\mu\text{M trolox}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Observa-se que os valores de RMECV e RMSEP, em geral foram menores que os modelos anteriormente construídos (Tabela 2). Alguns valores de RMSEP e RMSECV foram mais elevados, porém todos os erros relativos médios (%E) dos novos modelos apresentaram-se menores (<10%), o que justifica sua aplicação. A redução de RMSEP e RMSECV dos modelos MID não foram tão expressivas quanto do NIR, porém justificava-se utilizar a mesma faixa no NIR uma vez que o erro médio das previsões diminuiu.

O RPD é outro parâmetro utilizado para verificar a qualidade de modelos de calibração multivariada. Bons modelos de calibração devem possuir valor de RPD acima de 2,4, enquanto valores de RPD menor que 1,5 não devem ser utilizados (Williams e Norris, 2001). Observa-se que os modelos apresentaram valores de RPD maiores que 2,4, portanto, sendo os modelos PLS-OPS com maiores valores, sendo mais adequados para previsão.

Todos os modelos construídos com os espectros NIR e MID apresentaram elevados valores de correlações da calibração, da validação cruzada e da previsão

($r > 0,97$), sugerindo que as propriedades estão diretamente relacionadas com as características espectrais.

Nas Figuras 3 e 4 estão representadas as amostras de calibração (○) e predição (●) dos modelos PSL-OPS, com os espectros NIR e MID, respectivamente.

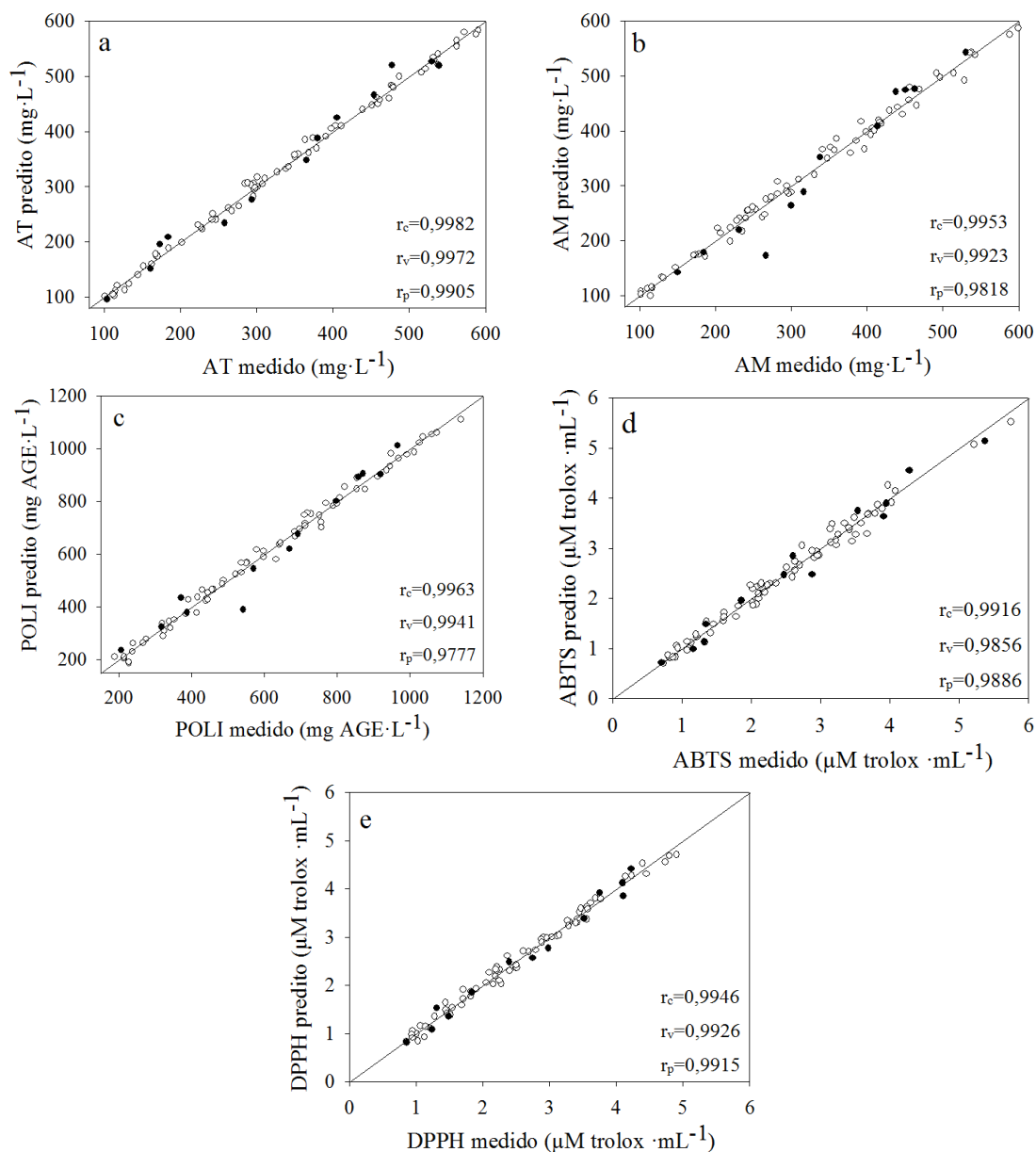


Figura 3 – Gráfico dos valores preditos *versus* valores medidos, para os espectros NIR. (○) Conjunto de calibração; (●) conjunto de predição. r_c : correlação da calibração; r_v : correlação da validação cruzada; r_p : correlação da previsão. AGE= ácido gálico equivalente. a) Antocianinas totais; b) Antocianinas monoméricas; c) Polifenóis totais; d) Capacidade antioxidante pelo ABTS; e) Capacidade antioxidante pelo DPPH

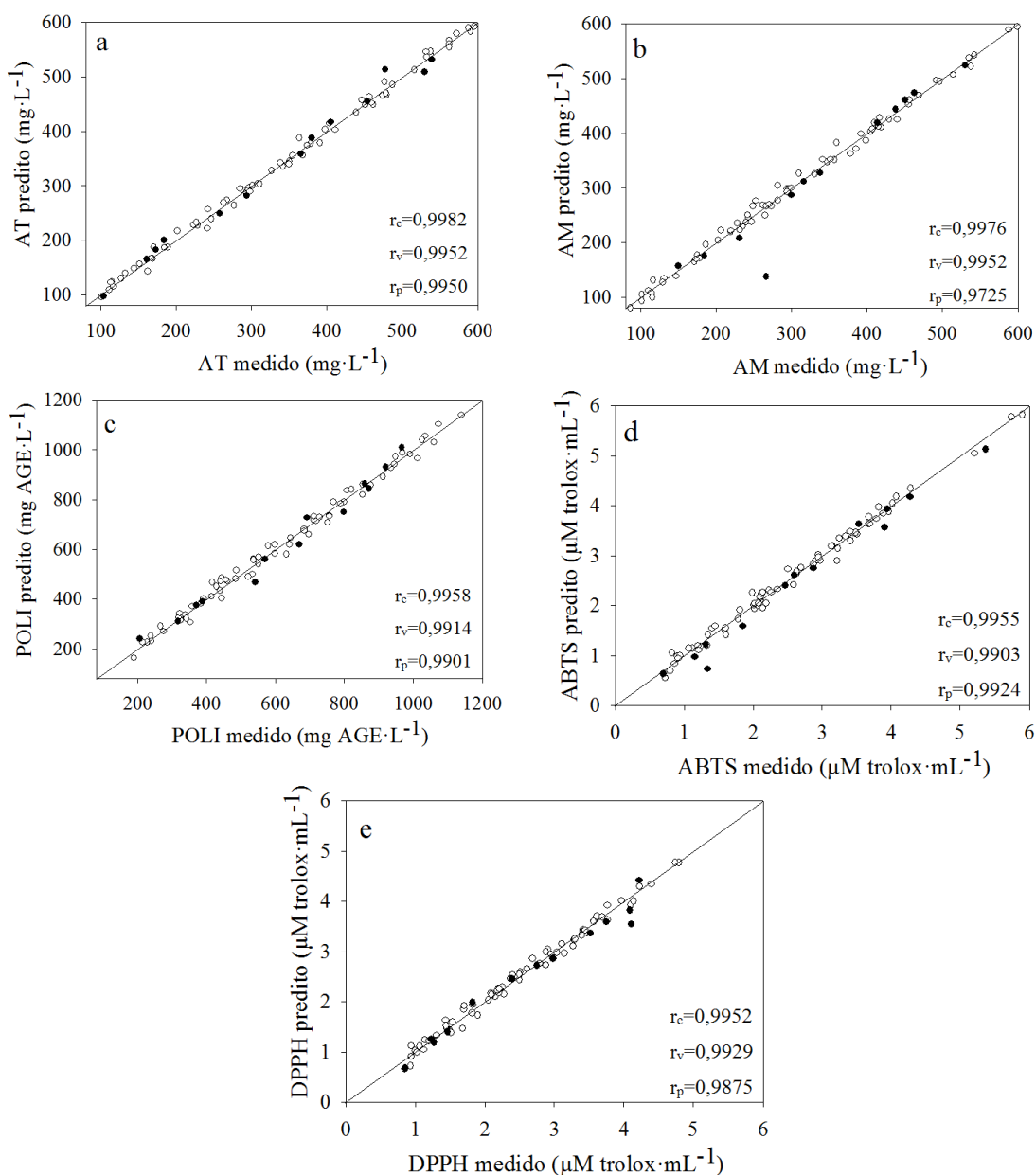


Figura 4 – Gráfico dos valores preditos *versus* valores medidos, para os espectros MID. (○) Conjunto de calibração; (●) conjunto de predição. r_c : correlação da calibração; r_v : correlação da validação cruzada; r_p : correlação da previsão. AGE= ácido gálico equivalente. a) Antocianinas totais; b) Antocianinas monoméricas; c) Polifenóis totais; d) Capacidade antioxidante pelo ABTS; e) Capacidade antioxidante pelo DPPH

Observa-se que as amostras da calibração e predição estão próximas à linha diagonal e segue tendência linear, evidenciando uma excelente calibração. Algumas amostras afastam-se levemente da reta, sendo isto ideal para o modelo ser capaz de prever tais variações. Os coeficientes de correlação dos modelos (r_c) e da validação cruzada (r_v) foram maiores que 0,99 e 0,97, respectivamente, evidenciando bons modelos de calibração. As amostras mais distantes em algumas propriedades (Figura 3b, 3c e 4b), referem-se provavelmente a *outliers* que permaneceram no conjunto de previsão, sendo

que isto não interferiu na qualidade dos modelos uma vez que os valores de correlação da previsão foram elevados ($r_p > 0,97$).

Elevados valores de correlação também foram encontrados em modelos PLS empregando NIR e MID ao determinar antocianinas ($r_v = 0,92$ e $r_v = 0,96$) e polifenóis totais ($r_v = 0,96$ e $r_v = 0,93$) em duas variedades de mirtilos ('Brigitta' e 'Duke') em diferentes graus de maturação (Sinelli et al., 2009); em diferentes genótipos de sorgo empregando NIR aliado ao PLS na detecção de fenólicos totais ($r_v = 0,93$) e antocianinas ($r_v = 0,82$) (Dykes et al., 2014); em diferentes modelos empregando PLS e NIR ao quantificar a capacidade antioxidante pelo ABTS (r_c e $r_p > 0,98$) e DPPH (r_c e $r_p > 0,80$) no extrato de bambu (Wu et al., 2012); e na quantificação de compostos fenólicos ($r_c = 0,93$) e capacidade antioxidante pelo DPPH ($r_c = 0,87$) em vinhos Moscatel empregando MID, porém, nos vinhos, as correlações de previsão foram menores tanto para compostos fenólicos ($r_p = 0,76$) como para a capacidade antioxidante pelo DPPH ($r_p = 0,61$) (Silva et al., 2014).

Ao comparar as correlações com outros estudos verifica-se que os valores de correlações são mais elevados no presente trabalho, revelando uma relação positiva entre as estimativas do infravermelho (NIR e MID) e os valores de referência. Estas elevadas correlações (Figura 3 e 4) indicam que o método pode prever efetivamente as propriedades.

Outro fator que importante na avaliação da efetividade do modelo é o erro médio relativo (%E). Segundo Ferreira (2015) erros médios acima de $\pm 10\%$ não produzem modelos confiáveis, já na faixa de $\pm 5\%$ os modelos são satisfatórios. Os valores de %E para os modelos com espectros NIR e MID podem ser observados nas Figuras 5 e 6, respectivamente.

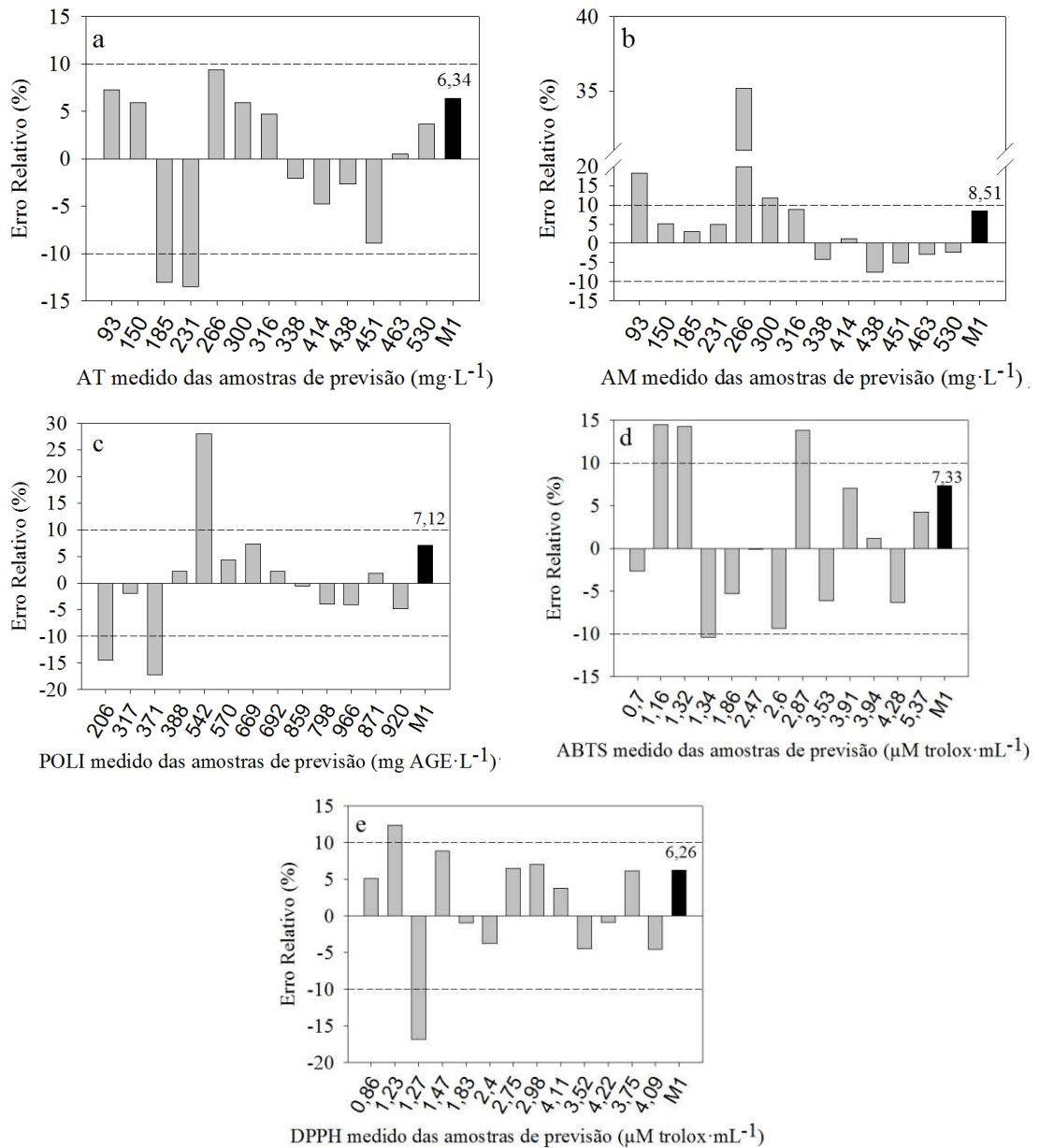


Figura 5 – Erro relativo para validação externa dos modelos com espectros NIR. Barras em cinza: amostras externas para previsão; barra preta (M1): erro médio relativo (média dos erros). a) Antocianinas totais; b) Antocianinas monoméricas; c) Polifenóis totais; d) Capacidade antioxidante pelo ABTS; e) Capacidade antioxidante pelo DPPH

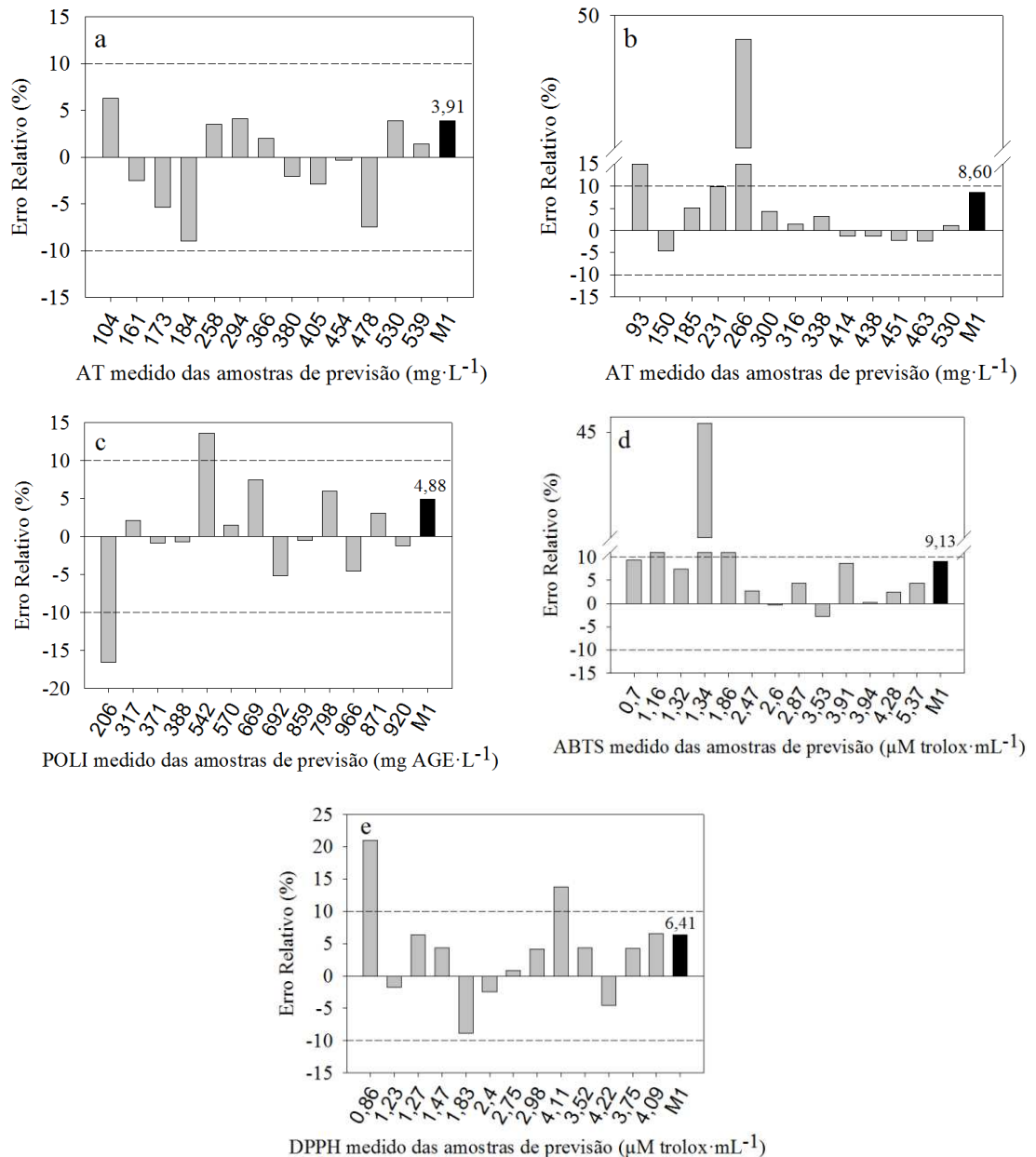


Figura 6 – Erro relativo para validação externa dos modelos com espectros MID. Barras em cinza: amostras externas para previsão; barra preta (M1): erro médio relativo (média dos erros). a) Antocianinas totais; b) Antocianinas monoméricas; c) Polifenóis totais; d) Capacidade antioxidante pelo ABTS; e) Capacidade antioxidante pelo DPPH

Observa-se que os erros médios das previsões estão abaixo de 10%, e poucas amostras ficaram acima deste limite, mostrando que os novos modelos são confiáveis. Os modelos com menores erros para antocianinas monoméricas e capacidade antioxidante (ABTS e DPPH) foram obtidos com os espectros NIR; já para antocianinas e polifenóis totais foram obtidos com espectros MID, sendo para estes os erros menores que 5%. Sendo assim, os modelos com NIR são considerados mais preditivos para as análises de antocianinas monoméricas e capacidade antioxidante e os espectros MID mais confiáveis

para antocianinas e polifenóis totais. Porém, ambas as espectrometrias são promissoras e podem ser utilizadas em análises futuras, proporcionando bons resultados. Esses resultados são encorajadores, evidenciando o potencial do infravermelho para determinar rapidamente o conteúdo destas propriedades nos extratos de repolho roxo.

Os melhores modelos foram obtidos através do PLS com seleção de variáveis, PLS-OPS. As variáveis selecionadas para os espectros NIR podem ser observadas na Figuras 7 e as selecionadas para os espectros MID na Figura 8.

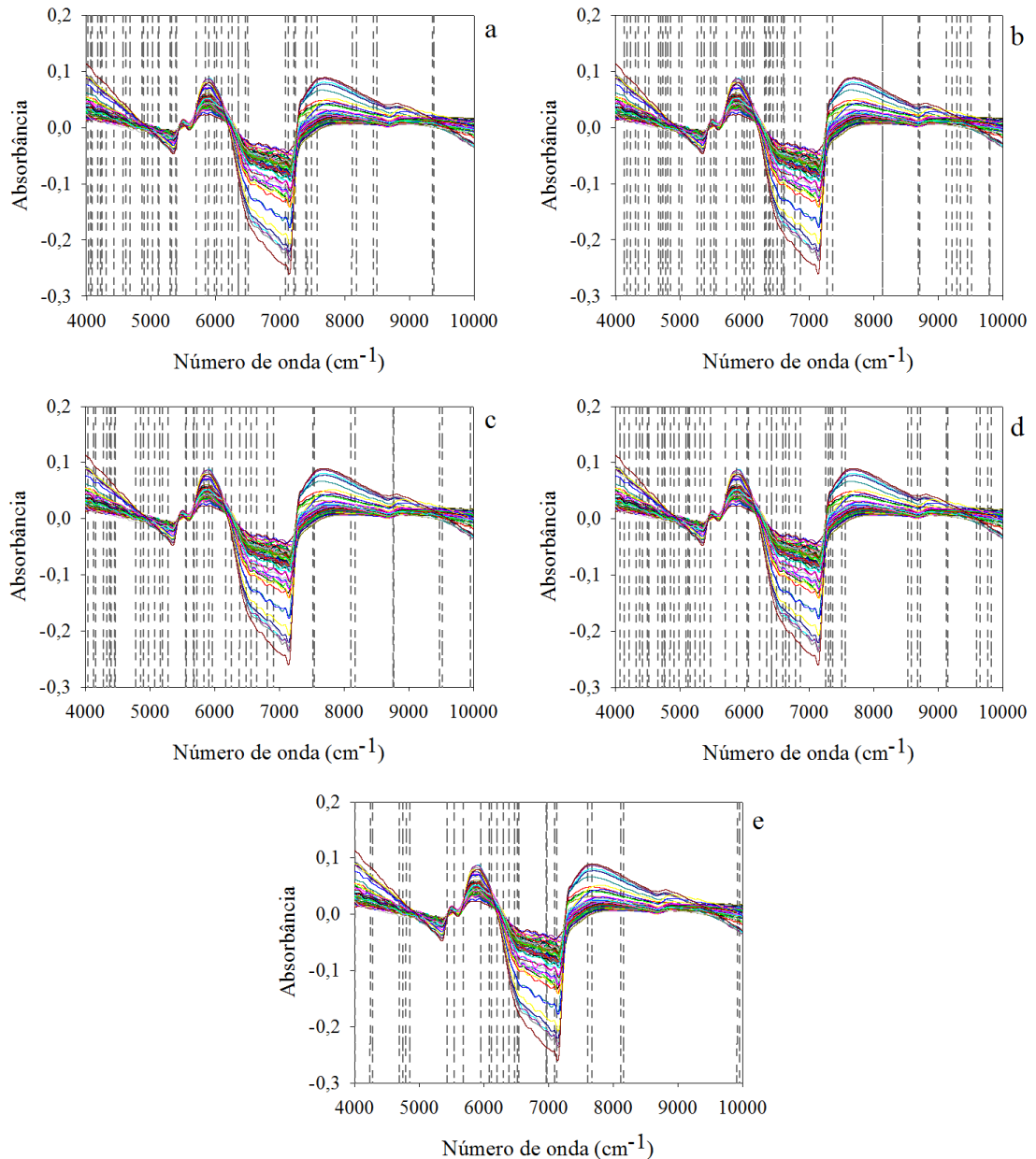


Figura 7 – Variáveis selecionadas dos espectros NIR para cada propriedade. Linhas tracejadas verticais representa as variáveis selecionadas. a) Antocianinas totais; b) Antocianinas monoméricas; c) Polifenóis totais; d) Capacidade antioxidante pelo ABTS; e) Capacidade antioxidante pelo DPPH

Nota-se que cada propriedade teve um conjunto de variáveis selecionadas específico, sendo as regiões $5727 - 5835 \text{ cm}^{-1}$ e $6240 - 6260 \text{ cm}^{-1}$ para o espectro NIR, comuns a todas as propriedades modeladas (Figura 7).

A região entre $5727 - 5835 \text{ cm}^{-1}$ além de ter sido a região NIR comum a todas as propriedades foi a primeira região selecionada pelo OPS, para a maioria das propriedades, sendo de maior importância. Esta região faz referência a região de absorção da ligação carbono e hidrogênio (C-H), onde 5799 cm^{-1} refere-se ao modo de combinações CH_3 de estiramento assimétricos e simétricos; 5756 cm^{-1} ao primeiro *sobreton* de CH_3 de alongamento simétrico e 5791 cm^{-1} ao primeiro *sobreton* de CH_2 (Barbosa, 2008; Silva *et al.*, 2014). Parte desta região ($5727 - 5847 \text{ cm}^{-1}$) contempla as bandas de absorção dos compostos fenólicos, justificando conter as primeiras variáveis selecionadas.

O número de onda de 5927 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C-H de vibração do anel de benzeno (Wu *et al.*, 2012), sendo este selecionado para antocianinas totais, polifenóis totais e capacidade antioxidante, pelo DPPH. O grupo fenol, presente nos compostos fenólicos, apresenta absorção na mesma região dos álcoois alifáticos, com primeiro *sobreton* entre $6940 - 7140 \text{ cm}^{-1}$ (Workman Jr e Weyer, 2008); esta região foi selecionada para antocianinas totais e capacidade antioxidante, pelo DPPH.

Outras regiões que os compostos fenólicos apresenta bandas de absorção são $5714 - 6060 \text{ cm}^{-1}$ e $4914 - 5115 \text{ cm}^{-1}$ (Dykes *et al.*, 2014). A faixa $5714 - 6060 \text{ cm}^{-1}$ contém regiões selecionadas para todas as propriedades. A região $4914 - 5115 \text{ cm}^{-1}$ contempla as primeiras variáveis selecionadas para capacidade antioxidante (ABTS) e regiões de outras propriedades: antocianinas totais, antocianinas monoméricas e polifenóis totais. Estas regiões selecionadas demonstram importância na modelagem e quantificação das antocianinas, compostos fenólicos e capacidade antioxidante (ABTS) no extrato de repolho, ressaltando que a absorção do grupo fenólico tem importância na determinação destas propriedades.

As regiões do espectro MID comuns a todas as propriedades modeladas foram $964 - 1022 \text{ cm}^{-1}$; $1286 - 1330 \text{ cm}^{-1}$; $1571 - 1574 \text{ cm}^{-1}$. (Figura 8).

Nos espectros MID, a faixa $900 - 2000 \text{ cm}^{-1}$ incluem a absorção infravermelha típica de moléculas fenólicas (Silva *et al.*, 2014), e abrange parte da região selecionada por todas as variáveis. Além disso incluindo parte da primeira região selecionada para capacidade antioxidante pelo DPPH ($964 - 1031 \text{ cm}^{-1}$), evidenciando ter importância na determinação desta propriedade.

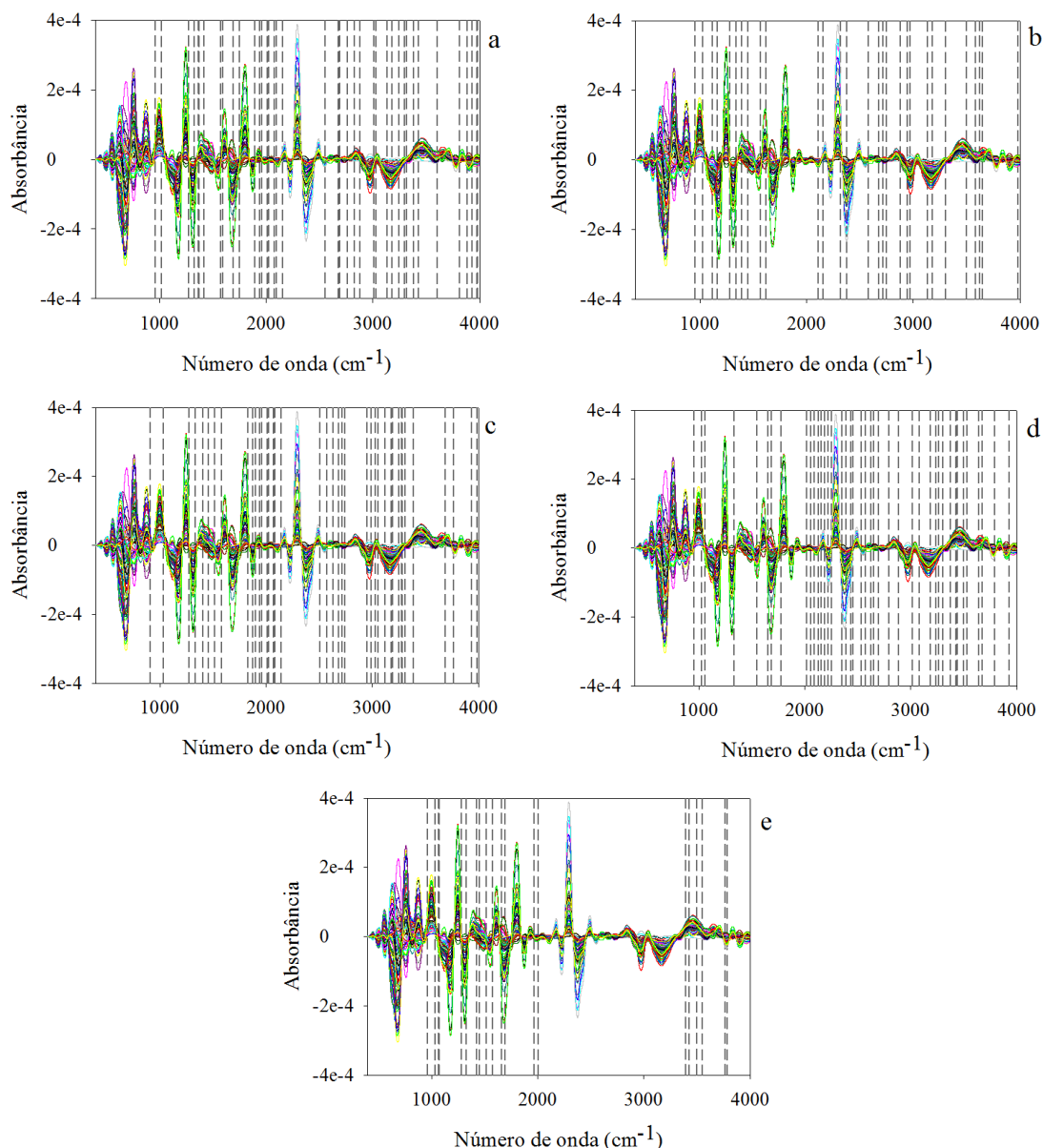


Figura 8 – Variáveis selecionadas dos espectros MID para cada propriedade. Linhas tracejadas verticais representa as variáveis selecionadas. a) Antocianinas totais; b) Antocianinas monoméricas; c) Polifenóis totais; d) Capacidade antioxidante pelo ABTS; e) Capacidade antioxidante pelo DPPH

Em relação as regiões MID comum a todas as propriedades (Figura 5), a região 964 – 1022 cm⁻¹ abrange a região referente as ligações RCH=CH₂ e -CH=CH-. A região 1423 – 1454 cm⁻¹, selecionada para pelo menos três propriedades, inclui as ligações C=C dos compostos aromáticos, a ligação CH₂ e curvatura assimétrica no plano da ligação CH₃. Também foram selecionadas regiões referente a ligações C-O e C-N (1279 – 1333 cm⁻¹), NH₂ e NO₂ (1545 – 1579 cm⁻¹), OH (3631 – 3651 cm⁻¹) e isotiocianatos (1959 – 2011 cm⁻¹) (Barbosa, 2008; Silva *et al.*, 2014).

As regiões selecionadas foram importantes para a previsão das propriedades do extrato de repolho roxo, demonstrando estreita correlação entre os espectros NIR e MID com as respostas analíticas, o que fez a previsão das propriedades do extrato de repolho usando a tecnologia infravermelha uma técnica espectroscópica ideal. A seleção de variáveis é útil para melhorar a capacidade de previsão e interpretação dos modelos.

Após a construção dos modelos, foram realizados testes para verificar a existência de correlação por chance (Figura 9 e 10) e estabilidade dos modelos (Figura 11 e 12).

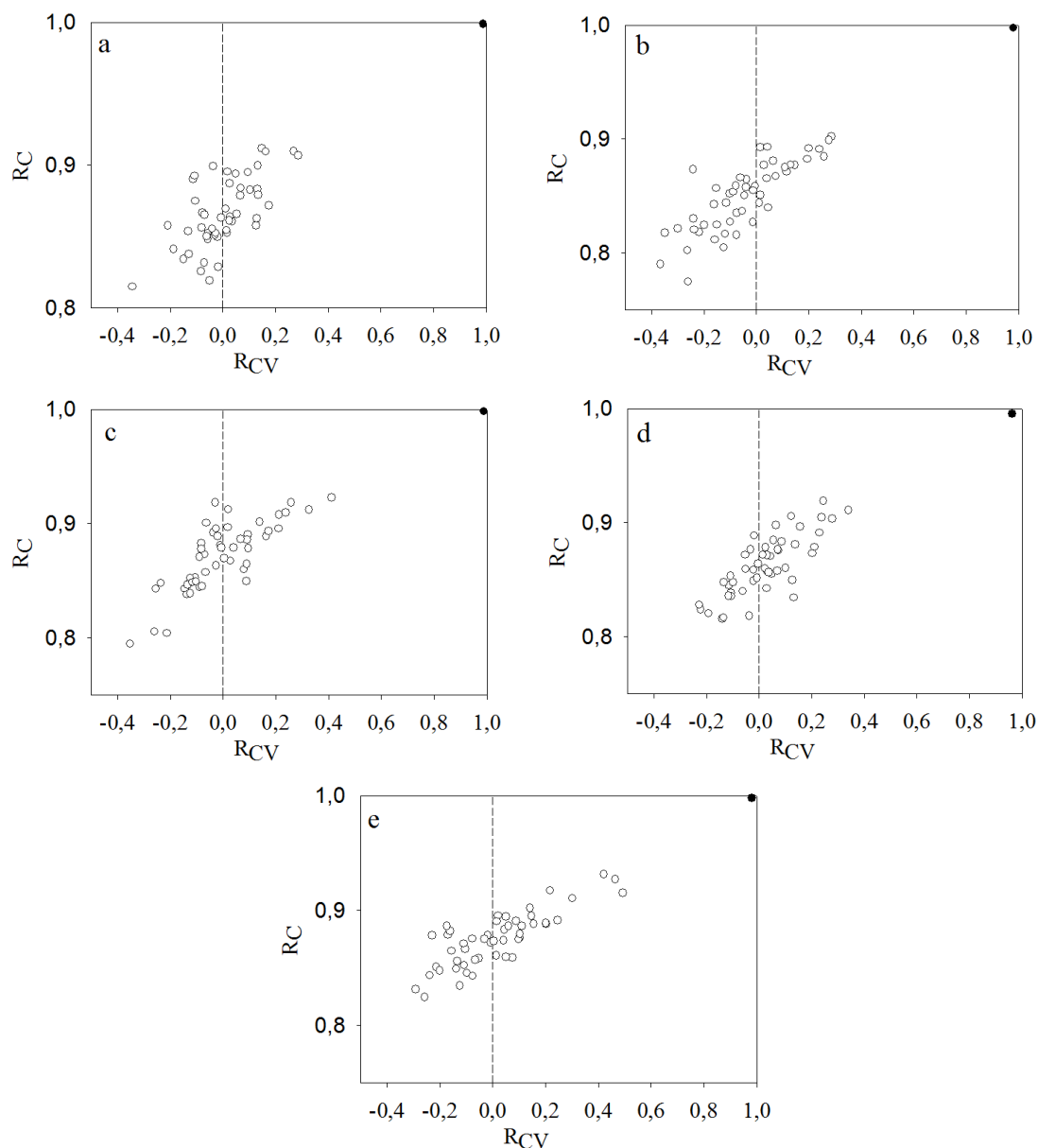


Figura 9 – Teste de correlação por chance para modelos PLS-OPS do espectro NIR. Legenda: R_C – correlação de calibração; R_{CV} – erro médio da validação cruzada; (○) Correlação por chance; (●) Correlação do modelo testado. a) Antocianinas totais; b) Antocianinas monoméricas; c) Polifenóis totais; d) Capacidade antioxidante pelo ABTS; e) Capacidade antioxidante pelo DPPH

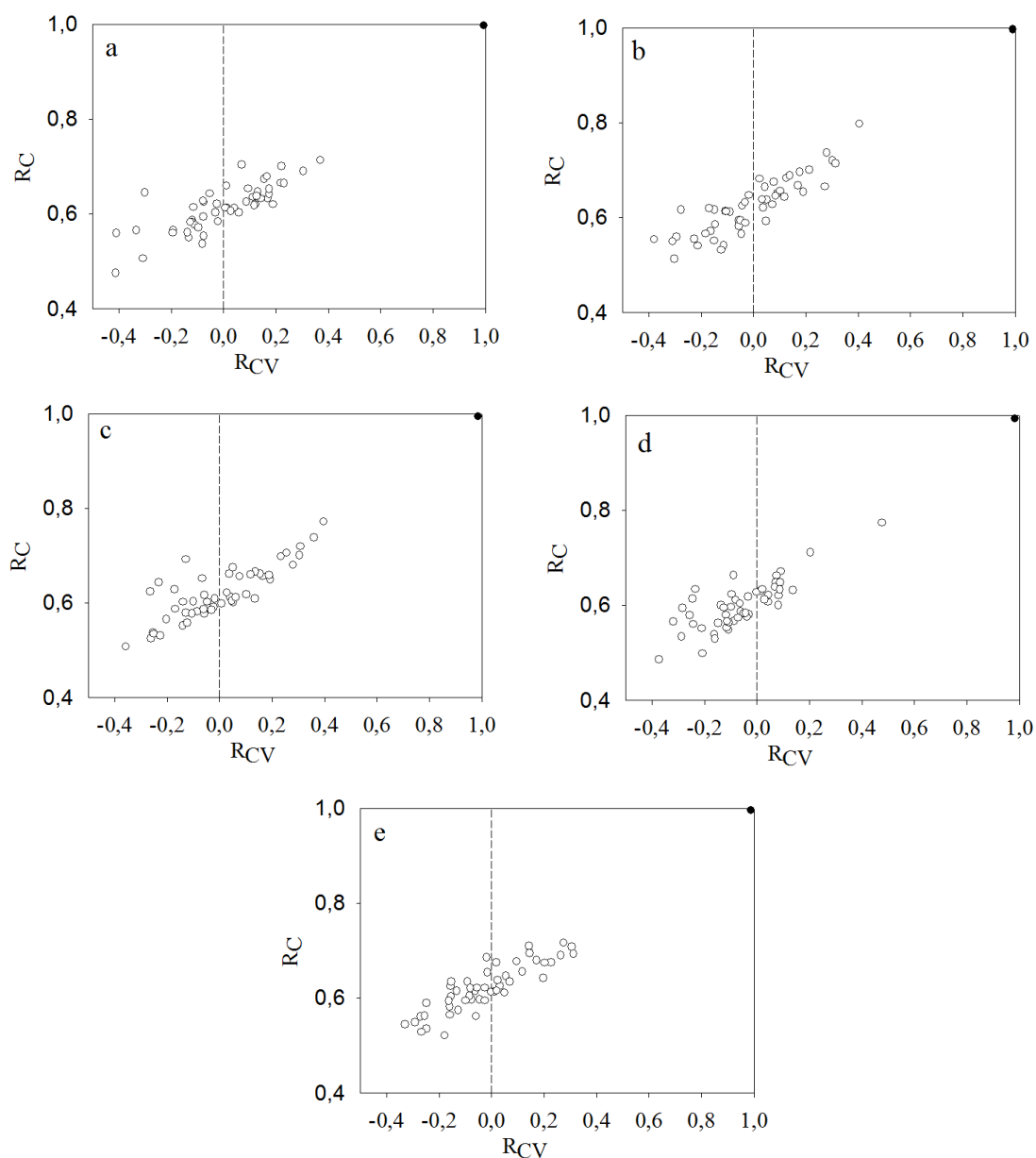


Figura 10 – Teste de correlação por chance para modelos PLS-OPS do espectro MID. Legenda: R_C – correlação de calibração; R_{CV} – erro médio da validação cruzada; (○) Correlação por chance; (●) Correlação do modelo testado. a) Antocianinas totais; b) Antocianinas monoméricas; c) Polifenóis totais; d) Capacidade antioxidante pelo ABTS; e) Capacidade antioxidante pelo DPPH

Analisando as Figura 9 e 10 observa-se que as 50 randomizações testadas contêm descritores que não estão estatisticamente correlacionadas (○) com as propriedades modeladas (correlações $<0,9$), porém os modelos avaliados (●) possuem alta correlação na calibração e na validação cruzada ($\cong 1,0$), mostrando que a correlação existente entre os espectros (NIR ou MID) e as propriedades estudadas são verdadeiras e não por chance. Estes dados estão de acordo com Tropsha, Gramatica e Gombar (2003) que preconiza que

todos os coeficientes de correlação para os conjuntos de validação devem ser $R^2 > 0,6$ e que os valores de R^2 dos modelos randomizados deve ser pequeno.

As Figuras 11 e 12 retratam a estabilidade dos modelos PLS-OPS para os espectros NIR e MID, respectivamente.

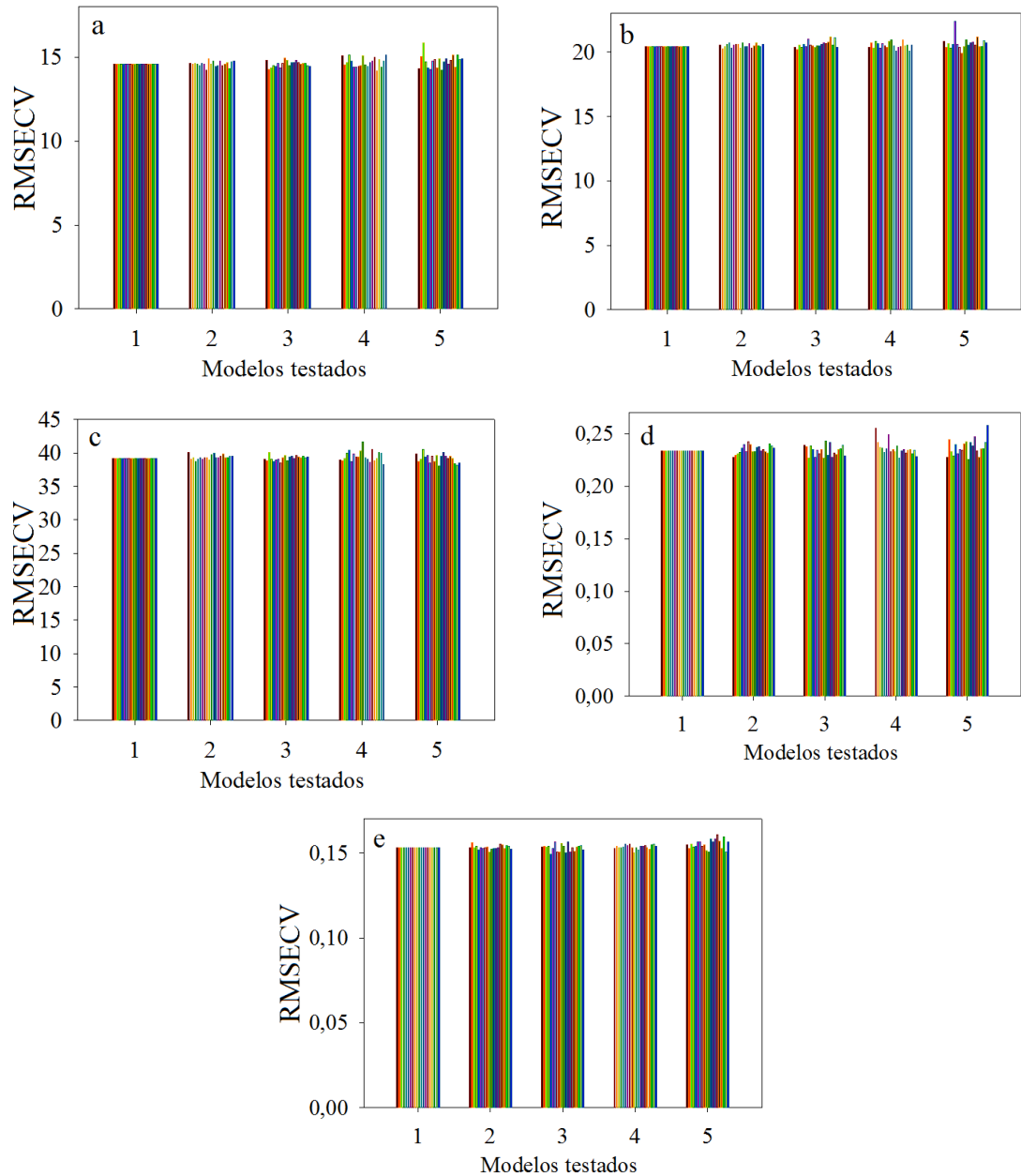


Figura 11 – Estabilidade dos modelos PLS-OPS para os espectros NIR, após remoção sucessiva de amostras. RMSECV: Raiz Quadrática Média do Erro de Validação Cruzada. a) Antocianinas totais; b) Antocianinas monoméricas; c) Polifenóis totais; d) Capacidade antioxidante pelo ABTS; e) Capacidade antioxidante pelo DPPH

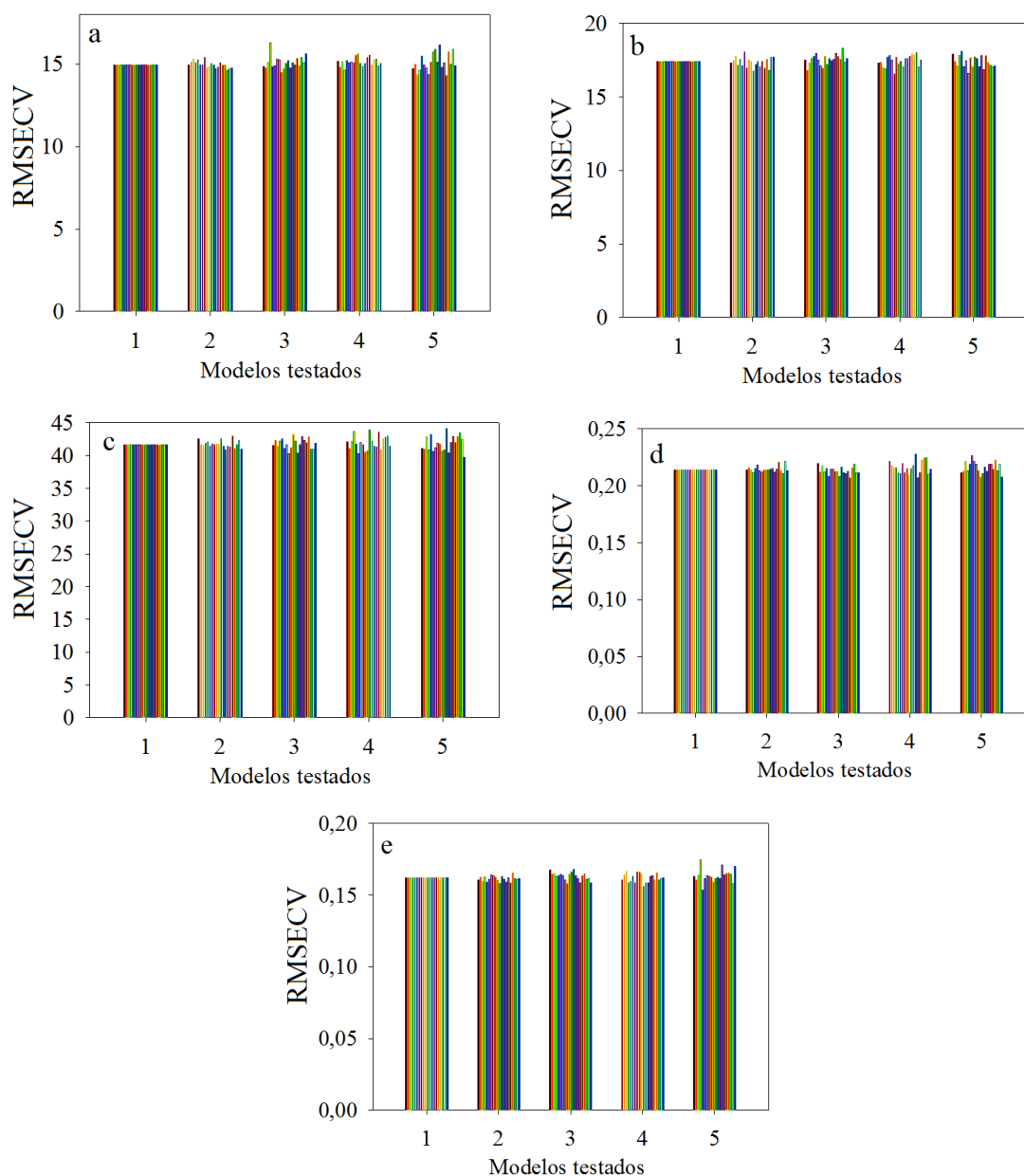


Figura 12 – Estabilidade dos modelos PLS-OPS para os espectros MID, após remoção sucessiva de amostras. RMSECV: Raiz Quadrática Média do Erro de Validação Cruzada. a) Antocianinas totais; b) Antocianinas monoméricas; c) Polifenóis totais; d) Capacidade antioxidante pelo ABTS; e) Capacidade antioxidante pelo DPPH

Para verificação da estabilidade do modelo foi aplicada remoção sucessivas de amostras, sendo que após tais remoções, o modelo apresentou pequena variação nas respostas, representada pela variação entre as barras das Figuras 11 e 12. Sendo assim, os modelos são considerados estáveis, e isto é uma indicação de estabilidade, pois mesmo com remoção de algumas amostras o modelo apresenta pouca variação nas respostas.

4 CONCLUSÃO

Os resultados dos modelos indicam que a espectroscopia NIR e MID é uma técnica adequada para prever as propriedades antocianinas (totais e monoméricas), polifenóis totais e capacidade antioxidante (DPPH e ABTS).

Os modelos PLS1 com seleção de variáveis usando o algoritmo OPS (PLS-OPS) apresentaram os melhores resultados para todas as propriedades. Os modelos com espectros NIR são considerados mais preditivos para as análises de antocianinas monoméricas e capacidade antioxidante e os espectros MID são mais adequados para análises de antocianinas totais e polifenóis totais.

A espectrometria NIR e MID apresentaram-se como técnicas mais vantajosas quando comparadas com os métodos convencionais, por serem não destrutivas, rápidas, de baixo custo e exigirem o mínimo preparo da amostra. Devido ao bom desempenho e praticidade na utilização da espectrometria NIR e MID para estas propriedades, os modelos propostos são úteis como prática rotineira de laboratório, bem como em indústrias de alimentos que utilizam este extrato como aditivo.

5 REFERÊNCIAS

Apolo11 – Latitude e Longitude das cidades Brasileiras. Disponível em <apolo11.com> acesso em: 08.12.14.

BARBOSA, L. C. DE A. **Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: Editora UFV, 2008. 189p.

BRASIL. **Resolução - RDC nº 34, de 9 de março de 2001**. Brasil, 2001.

CONSTANT, P. B. L. **Extração, caracterização e aplicação de antocianinas de açaí (*Euterpe oleracea*, M.)**. 183p. (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 2003.

DONG, W.; NI, Y.; KOKOT, S. A novel near-infrared spectroscopy and chemometrics method for rapid analysis of several chemical components and antioxidant activity of mint (*Mentha haplocalyx* briq.) samples. **Applied Spectroscopy**, v. 68, p. 245–254, 2014.

DYKES, L. *et al.* Prediction of total phenols, condensed tannins, and 3-deoxyanthocyanidins in sorghum grain using near-infrared (NIR) spectroscopy. **Journal of Cereal Science**, v. 60, p. 138–142, 2014.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria : Conceitos, Métodos e Aplicações**. Unicamp ed. Campinas, 2015. 496p.

FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanins in cranberries. **Journal of Food Science**, v. 33, p. 72–77, 1968.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *In*: WROLSTAD, R. E. (Ed.). **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. John Wiley & Sons, Inc., 2001. v.5, p.1–13.

HAMERSKI, L.; REZENDE, M. J. C.; SILVA, B. V. Usando as Cores da Natureza para Atender aos Desejos do Consumidor: Substâncias Naturais como Corantes na Indústria Alimentícia. **Revista Virtual de Química**, v. 5, p. 394–420, 2013.

HOLLMAN, P. C. H. Unravelling of the health effects of polyphenols is a complex puzzle complicated by metabolism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 559, p. 100–105, 2014.

KIM, D.-O. *et al.* Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, p. 3713–7, 2002.

KRUGER, M. J. *et al.* Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. **Food Research International**, v. 59, p. 41–52, 2014.

LACHMAN, J.; HAMOUZ, K. Red and purple coloured potatoes as a significant antioxidant source in human nutrition - A review. **Plant, Soil and Environment**, v. 51, p. 477–482, 2005.

MISITI, M. *et al.* **Wavelet Toolbox™ User 's Guide How to Contact MathWorks**. NatickMathWorks, 2015.

MONTES, J. M. *et al.* Grain quality determination by means of near infrared spectroscopy in *Jatropha curcas* L. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 301–305, 2013.

NORATTO, G. D. . *et al.* Anticarcinogenic effects of polyphenolics from mango (*Mangifera indica*) varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4104–4112, 2010.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 198–219, 2003.

PEDRO, A. M. K.; FERREIRA, M. M. C. Nondestructive determination of solids and carotenoids in tomato products by near-infrared spectroscopy and multivariate calibration. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 2505–2511, 2005.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. *et al.* Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods , oils and beverages : Extraction , measurement and expression of results. **Food Research Internationa**, v. 41, p. 274–285, 2008.

PLISZKA, B. *et al.* Stability and antioxidative properties of acylated anthocyanins in three cultivars of red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata L. f. rubra). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 1154–1158, 2009.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. Smoothing and differentiation by simplified least squares procedures. **Analytical Chemistry**, v. 36, p. 1627–1632, 1964.

SILVA, S. D. *et al.* Application of FTIR-ATR to Moscatel dessert wines for prediction of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 150, p. 489–493, 2014.

SINELLI, N. *et al.* Evaluation of quality and nutraceutical content in blueberries (*Vaccinium corymbosum*) by near and mid infrared spectroscopy. **Acta Horticulturae**, v. 810, p. 807–816, 2009.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–177, 1999.

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A. DE. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**, v. 55, p. 297–304, 2008.

TEÓFILO, R. F.; MARTINS, J. P. A.; FERREIRA, M. M. C. **OPS Toolbox 1.0** Unicamp, Brasil, INPI - 0000270703255138, , 2007.

TERESA, S. D. P. Molecular mechanisms involved in the cardiovascular and neuroprotective effects of anthocyanins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 559, p. 68–74, 2014.

TROPSHA, A.; GRAMATICA, P.; GOMBAR, V. K. The importance of being earnest: Validation is the absolute essential for successful application and interpretation of QSPR models. **Qsar & Combinatorial Science**, v. 22, p. 69–77, 2003.

VOLDEN, J. *et al.* Effect of thermal treatment on glucosinolates and antioxidant-related parameters in red cabbage (*Brassica oleracea* L. ssp. capitata f. rubra). **Food Chemistry**, v. 109, p. 595–605, 2008.

WICZKOWSKI, W.; SZAWARA-NOWAK, D.; TOPOLSKA, J. Red cabbage anthocyanins: Profile, isolation, identification, and antioxidant activity. **Food Research International journal**, v. 51, p. 303–309, 2013.

WILLIAMS, P.; NORRIS, K. **Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries**. 2nd. ed. St. Paul: American Association of Cereal Chemists Inc., 2001. 296p.

WISE, B. M. *et al.* **PLS_Toolbox 4.2: for use with MATLAB**. Wenatchee: Eigenvector Research, Inc., 2006. 426p.

WORKMAN JR, J.; WEYER, L. **Practical Guide to Interpretive Near-Infrared Spectroscopy**. 1. ed. New York: Taylor & Francis Group, 2008.

WU, D. *et al.* Application of near infrared spectroscopy for the rapid determination of antioxidant activity of bamboo leaf extract. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2147–2156, 2012.

XU, L. *et al.* Ensemble preprocessing of near-infrared (NIR) spectra for multivariate calibration. **Analytica Chimica Acta**, v. 616, p. 138–143, 2008.

YAMAGATA, K.; TAGAMI, M.; YAMORI, Y. Dietary polyphenols regulate endothelial function and prevent cardiovascular disease. **Nutrition**, v. 31, p. 28–37, 2015.

ARTIGO III

DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE ANTOCIANINAS, POLIFENÓIS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM EXTRATOS DE UVA VIOLETA (*Vitis labrusca*, var *BRS violeta*) POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO E MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

RESUMO

O desenvolvimento de um método rápido para a determinação de antocianinas totais, polifenóis totais e capacidade antioxidante em extrato de uva violeta (*Vitis labrusca*, var *brs violeta*) empregando as espectroscopias na região do infravermelho próximo (NIR) e infravermelho médio (MID) em conjunto com a regressão por quadrados mínimos parciais (PLS) foi objetivo deste trabalho. Extratos de uva foram obtidos com solução etanólica 70% (v/v) e concentrado até 9 °Brix. Em seguida o extrato foi diluído em proporções de 5 a 100 % em água para determinação das propriedades: antocianinas totais, polifenóis totais e capacidade antioxidante determinadas pelo DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazina). Espectros NIR na faixa 10000 a 4000 cm^{-1} empregando absorvância e MID na faixa 4000 a 650 cm^{-1} empregando refletância total atenuada (ATR) foram obtidos das amostras. Os extratos apresentaram antocianinas totais de 18,13 a 3294,30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, polifenóis totais de 71,68 a 4350,37 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e a capacidade antioxidante pelo método DPPH variou de 0,35 a 15,97 $\mu\text{M trolox}\cdot\text{mL}^{-1}$. Aplicou-se a regressão PLS1 aliada ao método de seleção dos preditores ordenados (OPS) nos espectros alisados e pré-processados. Os modelos PLS-OPS apresentaram melhores resultados, mas apesar de apresentar elevados valores de correlação (r) e relação de desempenho do desvio (RDP) todos apresentaram elevados erro médio quadrático de calibração e previsão (RMSECV e RMSEP). Ao trabalhar com valores de DPPH entre 1,3 a 15,97 $\mu\text{M trolox}\cdot\text{mL}^{-1}$, fazendo alisamento, correção da linha de base e 1ª derivada (janela 17), aliado ao OPS, o modelo do espectro MID pôde prever bem esta propriedade nos extratos de uva violeta. O método com espectro MID foi eficiente para prever a capacidade antioxidante pelo DPPH, onde apresentou erros médio de 5,24%, RMSEP de 0,63 e correlação elevada ($r_p > 0,99$). O método não apresentou-se satisfatório para antocianinas e polifenóis totais.

Palavras chaves: quimiometria, atividade antioxidante e compostos fenólicos

1 INTRODUÇÃO

Devido a grande preocupação com a saúde, o apelo ao consumo de compostos que combatem os radicais livres está em ascensão, e com isto cresce também o número de trabalhos que visam determinar a capacidade antioxidante de diversas matrizes alimentares. Alguns alimentos possuem naturalmente compostos antioxidantes, sendo de grande interesse para a indústria a utilização deste composto ativo como aditivo.

As antocianinas são um grupo pertencente à classe dos compostos fenólicos que apresentam a característica de fornecer cor, que varia desde o azul ao vermelho. Além desta propriedade, o consumo regular de alimentos contendo estes compostos estão associados a determinados benefícios à saúde, como a inibição da acumulação de colesterol sanguíneo, redução do risco de doenças coronarianas, prevenção de alguns tipos de câncer e diabetes, entre outros benefícios (Hollman, 2014; Kruger *et al.*, 2014; Lachman e Hamouz, 2005; Teresa, 2014; Yamagata, Tagami e Yamori, 2015).

Diante destas características, as antocianinas são utilizadas como aditivo alimentares (BRASIL, 2001), na forma de extratos líquidos ou em pó (Hamerski, Rezende e Silva, 2013). Dentre as diversas fontes de antocianinas, destacam-se a uva e o repolho roxo, que são empregados comercialmente como fonte desse pigmento (Constant, 2003; Teixeira, Stringheta e Oliveira, 2008). Em decorrência das restrições cada vez mais rígidas para o uso de corantes na indústria de alimentos, são necessários mais estudos para uma correta substituição dos corantes sintéticos por corantes naturais (como as antocianinas).

Devido ao seu grande emprego comercial, surgiu o interesse de se investigar a composição bioativa dos extratos de uva. Porém, é importante considerar que os métodos de referência de determinação da capacidade antioxidante e da composição bioativa são morosos, destrutivos e consomem grande quantidade de reagentes químicos, que na maioria das vezes são de alto custo (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). Estes métodos vão contra a necessidade de se obter respostas em um menor tempo e com menor custo, características que as empresas sempre preconizam ao adotar um método. Neste contexto, há a necessidade de se desenvolver métodos analíticos rápidos, precisos, não destrutivos e que respeitem o meio ambiente.

A espectroscopia no infravermelho somada à tratamentos de dados quimiométricos vem sendo utilizada para realizar previsões de propriedades químicas e físicas de alimentos, fármacos, produtos de origem agrícola e outras matrizes complexas,

com resultados rápidos e exatos (Pasquini, 2003; Saurina, 2010; Xu *et al.*, 2008). Muitos trabalhos já veem sendo realizados nesta área em diversas amostras alimentares e na determinação de várias propriedades: Sinelli *et al.* (2009) determinou antocianinas, flavonoides, polifenóis e ácido ascórbico em mirtilos; Dykes *et al.* (2014) analisou o teor de polifenóis totais, taninos condensados e antocianinas em sorgo; Wu *et al.*, (2012) quantificou a capacidade antioxidante em extrato de bambu; Dong, Ni e Kokot (2014) trabalhou com menta avaliando polissacarídeos, polifenóis totais, flavonoides e capacidade antioxidante; entre outros.

Diante disto, o objetivo deste trabalho foi propor um método simples e rápido para determinação dos componentes antioxidantes (antocianinas, polifenóis totais e capacidade antioxidante) no extrato de uva violeta usando as espectroscopias NIR e MID aliada à regressão PLS.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do extrato e análises de referência

A uva violeta (*Vitis labrusca*, var *BRS Violeta*) foi doada pela Estação Experimental de Viticultura Tropical da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), na cidade de Jales, noroeste do estado de São Paulo, Brasil (Latitude: -20° 16' 08" e Longitude: -50° 32' 45", e 476 m acima do nível do mar, referenciado por apolo11). A amostra foi obtida em duas épocas: julho de 2013 e 2014.

As amostras foram encaminhadas ao laboratório e a extração realizada. As amostras provenientes de julho de 2014 foram imediatamente extraídas e fizeram parte do primeiro conjunto de extração. As amostras de 2013 foram congeladas e extraídas em janeiro de 2015, para compor o segundo conjunto de extração.

As cascas da uva violeta foram trituradas em solução etanólica 70% (v/v) em volume suficiente para cobrir o material sólido. A mistura foi acidificada com HCl 1,5 mol·L⁻¹ até pH 2 e deixada em repouso em ausência de luz por 24 h a 7 °C ± 1 °C. Após 24 h as amostras foram filtradas a vácuo em papel Whatman n° 1. O solvente do extrato foi removido em evaporador rotativo (MA 120, Marconi), sendo os extratos obtido (9° Brix) misturados e mantidos sob congelamento (-18° C) até o momento da análise. Antes das análises foram realizadas 50 diluições seriadas, contendo de 5 – 100% do extrato.

O segundo conjunto de amostras passou pelo mesmo processo de extração descrito para o primeiro conjunto. Neste segundo momento foram realizadas 10 diluições seriadas, contendo de 5 – 100% do extrato. Os dois conjuntos (extrato concentrado e diluições) totalizaram 60 amostras.

As análises de antocianinas totais, polifenóis totais e capacidade antioxidante (pelo radical DPPH) foram realizadas no extrato concentrado e nas suas diluições conforme descritos nos itens a seguir. Todas as análises foram realizadas em duplicata, sendo a diluição central realizada com 5 repetições.

2.1.1 Antocianinas totais

O teor de antocianinas totais foi determinado pelo método de Fuleki e Francis (1968) utilizando o solvente etanol: HCl 1,5 mol·L⁻¹ (85:15) para diluição das amostras e calibração do espectrofotômetro (UV-1601 PC, Shimadzu). As amostras foram submetidas a leitura espectrofotométrica a 535 nm e o teor de antocianinas totais obtido pela Equação 1.

$$C' = \frac{A \times FD}{\mathcal{E} \times b} \quad \text{Eq. 01}$$

em que: A = Absorbância (ABS) em 535 nm; \mathcal{E} = Coeficiente de absorvidade de cianidinas (98,2); C' = Concentração de antocianina (mg·L⁻¹), expressa em cianidina-3-glicosídeo (g·L⁻¹); b = espessura da cubeta (1 cm); FD = Fator de diluição do extrato.

2.1.2 Polifenóis totais

Para a eliminação dos interferentes dos compostos fenólicos, as amostras foram eluídas em cartucho de separação C18 (Sep-Pak Vac 35cc – Waters), para remoção dos interferentes da análise (ácido ascórbico, açúcares e aminoácidos) (Noratto, *et al.*, 2010). Inicialmente o cartucho foi condicionado com 50 mL de metanol acidificado (0,01 % de HCl) e 50 mL de água destilada. Posteriormente, uma alíquota de 20 mL do extrato aquoso foi eluída no cartucho de separação. Os interferentes foram removidos por meio da passagem de 100 mL de água destilada pelo cartucho, ficando os polifenóis adsorvidos. O extrato polifenólico livre de interferentes foi eluído do cartucho com 50 mL de metanol (Noratto *et al.*, 2010). O metanol foi eliminado em evaporador rotativo e a amostra redissolvida em água destilada.

O teor de fenólicos totais nos extratos foi estimado utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu, de acordo com o método proposto por Singleton, Orthofer e Lamuela-

Raventós (1999). A absorvância em 760 nm foi lida em espectrofotômetro (UV-1601 PC Shimadzu) contra o branco. Uma curva padrão de ácido gálico foi utilizada para expressar os resultados em Equivalentes de Ácido Gálico (AGE) e o valor final expresso em mg AGE (ácido gálico equivalente) por litro de amostra.

2.1.3 Capacidade antioxidante

A determinação da capacidade antioxidante foi avaliada pelo ensaio TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao trolox) com o radical DPPH (Kim *et al.*, 2002 com modificações). O padrão utilizado foi o antioxidante sintético trolox nas concentrações de 20 a 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e o resultado expresso em $\mu\text{M Trolox}\cdot\text{mL}^{-1}$. O DPPH• (2,2-difenil-1-picril hidrazina) foi preparado a uma concentração de 0,1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, em etanol 80%, usando a ABS para correção da concentração.

O espectrofotômetro foi calibrado com solução etanólica 80%. Para a reação da amostra com o radical foi utilizada a proporção de 0,5:3,5, sendo o tempo de reação das amostras com o radical DPPH• de 30 min (após determinação de cinética). A leitura após as reações foi determinada a 517 nm em espectrofotômetro (UV-1601 PC Shimadzu). Para construção da curva padrão de trolox e leitura do branco (álcool etílico 80%) seguiu-se o mesmo procedimento da amostra.

2.2 Obtenção dos espectros e tratamento quimiométrico dos dados

Os espectros NIR e MID foram adquiridos imediatamente após a realização das análises de referência. Dois espectros de cada amostra foram obtidos com 32 varreduras cada, usando o *software* do instrumento. O branco, em ambos os espectrofotômetros, foi realizado com água destilada no início e a cada 10 leituras para evitar deslocamento excessivo da linha de base e remover a informação da água.

As leituras na região do infravermelho próximo (NIR) foram realizadas em um espectrômetro com transformada de Fourier, modelo Varian 660-IR, com acessório para cubeta no modo transmitância. Aplicou-se o logaritmo do inverso da transmitância para obter a absorvância, que foi usada para construir os modelos. Uma alíquota do extrato, sem tratamentos prévios, foi adicionada à cubeta de quartzo com caminho óptico de 5 mm. A faixa investigada foi de 10000 a 4000 cm^{-1} com incremento de 4 cm^{-1} .

A coleta dos espectros do infravermelho médio (MID) foi realizada em espectrômetro Thermo Scientific, Nicolet 6700 FT-IR, com acessório de refletância total atenuada (ATR), com compartimento da amostra em cristal de germânio. Uma alíquota

apropriada da amostra, sem tratamentos prévios, foi adicionada sobre o acessório ATR. A faixa investigada foi de 4000 a 650 cm^{-1} .

2.2.1 Calibração multivariada

O método de regressão por quadrados mínimos parciais (PLS) foi utilizado para construir os modelos de calibração. Na tentativa de minimizar os efeitos causados por variações aleatórias ou sistemáticas indesejáveis de diferentes origens, foram empregadas técnicas de pré-tratamentos matemáticos nos espectros, antes da construção do modelo, para que estas variações não tivessem influência nos resultados finais.

Os espectros originais foram alisados para aumentar a relação S/R, os espectros NIR e MID tiveram a linha de base corrigida e transformados pela aplicação da primeira ou segunda derivada.

As amostras foram divididas em dois conjuntos (calibração e previsão), sendo aproximadamente 15% das amostras (15 amostras) separadas para previsão externa. A validação cruzada com amostragem aleatória foi utilizada para a escolha do número de variáveis latentes (n_{VL}).

Para identificação de amostras anômalas, os valores de *leverage*, conhecido também como poder de alavancagem, e resíduos de Student foram calculados conforme Equações 11 e 12 do referencial teórico, respectivamente.

A validação externa foi realizada e os modelos preditivos, considerando menor erro quadrático médio de previsão (RMSEP) e maior coeficiente de correlação (r), foram escolhidos conforme Equações 13 e 14 do referencial teórico.

Para indicar a qualidade dos modelos, a relação de desempenho do desvio (RPD) foi calculada conforme Equação 15 (do referencial teórico). Embora o método PLS funcione bem para um grande número de variáveis, o algoritmo da seleção dos preditores ordenados (OPS) foi aplicado para selecionar as variáveis mais importante para o modelo (Teófilo, Martins e Ferreira, 2007). Deste modo, além da regressão para cada propriedade sem seleção de variáveis (PLS-1), realizou-se a regressão com seleção de variáveis pelo OPS (PLS-OPS).

Os cálculos foram realizados pelo PLS_Toobox 6.5 (Eigenvector Research, Inc., USA) para Matlab, Matlab 7.0 (The MathWorks, Co., USA) e o pacote de algoritmos, OPS_Toolbox (Teófilo, Martins e Ferreira, 2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra a estatística descritiva (valores mínimos e máximos, média e desvio padrão relativo) dos parâmetros químicos avaliados nos extratos de uva violeta, determinada pelo método referência. Uma faixa relativamente ampla da composição nos parâmetros químicos foi observada devido às diferentes diluições utilizadas, visando atingir toda a gama de extratos futuros. A composição antioxidante na uva violeta já havia sido avaliada (Rebello *et al.*, 2013).

Na Tabela 1 observa-se os conjuntos de calibração e previsão. Neste estudo, o subconjunto de calibração e previsão foram divididos usando o algoritmo *kenston* (Kennard e Stone, 1996). O conjunto de calibração continha 108 amostras, e as outras 15 amostras constituíram o conjunto de previsão. Nenhuma amostra foi utilizada nos conjuntos de calibração e de previsão, ao mesmo tempo.

Tabela 1 – Estatística descritiva das propriedades dos extratos de uva violeta

Conjunto	Propriedades	AT	POLI	DPPH
Calibração $N_C=108$	Valor mín.	18,13	71,68	0,35
	Valor máx.	3294,30	4350,37	15,97
	Média	1364,92	1898,73	8,20
	RSD%	65,69	57,57	54,12
Previsão $N_P=15$	Valor mín.	48,17	70,91	0,31
	Valor máx.	2377,80	3689,07	12,94
	Média	599,24	1152,71	5,53
	RSD%	122,50	103,42	91,72

RSD: desvio padrão relativo = (desvio padrão/média)*100; AT: Antocianinas Totais ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); AM: Antocianinas Monoméricas ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); POLI: Polifenóis totais (mg de ácido gálico equivalente $\cdot\text{L}^{-1}$); ABTS: $\text{TEAC}_{\text{ABTS}}$ (μM trolox $\cdot\text{mL}^{-1}$); DPPH: $\text{TEAC}_{\text{DPPH}}$ (μM trolox $\cdot\text{mL}^{-1}$).

Para comparar o desempenho de diferentes modelos, as amostras de previsão foram mantidas inalteradas para todos os modelos de calibração. O conjunto de calibração, no entanto, pode ter ocorrido diferenças entre cada modelo após remoção dos *outliers*, que são específicos de cada propriedade e pré-processamento. Para a construção de cada modelo PLS, amostras que apresentaram *leverage* e/ou resíduos de Student elevados foram considerados amostras anômalas (*outliers*).

Os espectros originais obtidos para as amostras de extratos de uva violeta pelo NIR e MID podem ser observados na Figura 1.

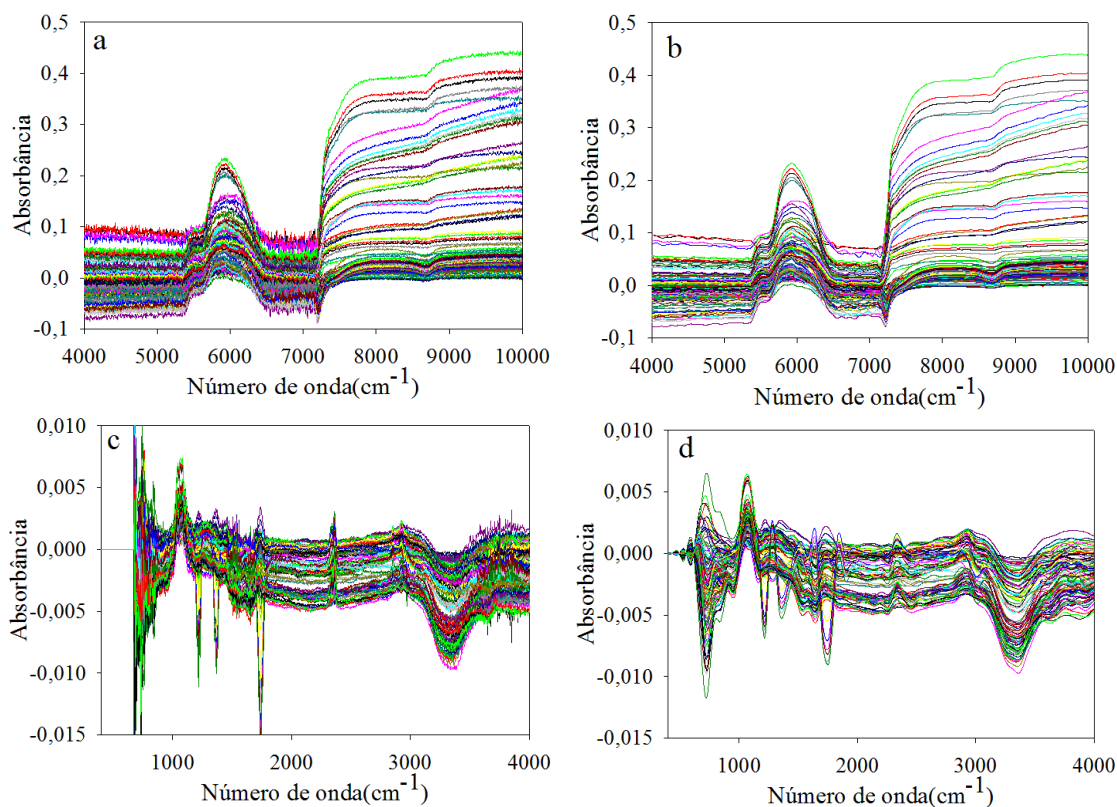


Figura 1 – Espectros na região do infravermelho para extratos de uva violeta. a) espectros NIR originais; b) espectros NIR alisados; a) espectros MID originais; b) espectros MID alisados

Os espectros (Figura 1a) apresentaram certa homogeneidade, porém observa-se que nas concentrações mais elevadas, nos espectros NIR, próximo a 7000 cm^{-1} e 8750 cm^{-1} começam a tornasse mais evidente a variação entre as amostras. Os espectros também apresentaram ruído e deslocamento da linha de base, evidenciando que os pré-tratamentos matemáticos são essenciais para reduzir a interferência de variações físicas indesejadas e aumentar a relação sinal/ruído.

Os espectros NIR e MID originais foram inicialmente transformados pelo alisamento *wavelet* (Misiti *et al.*, 2015) (Figura 1b e 1d) para suavizar os ruídos. Pode-se observar que o alisamento não eliminou qualquer característica importante dos espectros, e assim, toda a informação química relevante foi mantida para a construção do modelo. Para corrigir deslocamentos da linha de base os espectros receberam outras transformação empregando o algoritmo *baseline* (Wise *et al.*, 2006). A primeira ou segunda derivada foi aplicada pelo algoritmo Savitsky Golay (Savitzky e Golay, 1964), com diferente janela móvel, específica para cada propriedade. O alisamento melhorou a relação sinal/ruído, enquanto a correção da linha de base e a primeira derivada eliminaram deslocamentos constantes indesejáveis.

Modelos PLS foram aplicados aos espectros pré-processados (alisados, centrados na média e transformados) na análise de antocianinas totais, polifenóis totais e capacidade antioxidante (pelo radical DPPH). Os resultados calculados com diferentes algoritmos de pré-processamento nos processos de calibragem e de predição são apresentados nas Tabelas 2 a 4. Para cada pré-processamento foram construídos 2 modelos: (1) modelo PLS-1 para cada propriedade e com todas as variáveis; (2) modelo PLS para cada propriedade e com variáveis selecionadas pelo método OPS (PLS-OPS).

Tabela 2 – Resultados preditivos de antocianinas totais ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) dos extratos de uva violeta usando espectroscopia infravermelho e PLS

	Pré-processamento	Seleção de variáveis	<i>nVL</i>	<i>out</i>	RMSECV	RMSEP	r_v	r_p	RPD
NIR	Alisamento	-	9	8	169,28	282,64	0,9808	0,9397	5,06
	Alisamento	OPS	9	8	132,88	236,86	0,9882	0,9514	6,51
	Alis;D1 _(j21)	-	6	8	174,81	201,63	0,9781	0,9801	4,74
	Alis;D1 _(j21)	OPS	6	8	149,51	230,63	0,9840	0,9725	5,58
	Alis;D2 _(j21)	-	9	8	209,89	378,10	0,9718	0,9167	4,22
	Alis;D2 _(j21)	OPS	9	8	172,52	415,83	0,9808	0,9009	5,11
	Alis;base	-	7	8	173,41	351,99	0,9791	0,9238	4,84
	Alis;base	OPS	7	8	124,50	200,79	0,9892	0,8938	6,81
	Alis;base;D _(j21)	-	6	8	197,45	218,73	0,9727	0,9734	4,27
	Alis;base;D1 _(j21)	OPS	6	8	164,09	221,83	0,9812	0,9749	5,14
MID	Alisamento	-	11	7	161,00	331,43	0,9835	0,9300	5,47
	Alisamento	OPS	11	7	125,94	252,73	0,9900	0,9545	7,06
	Alis;D1 _(j19)	-	14	10	166,39	183,28	0,9812	0,9755	5,14
	Alis;D1 _(j19)	OPS	14	10	130,17	166,43	0,9885	0,9798	6,62
	Alis;D2 _(j19)	-	9	8	214,88	583,76	0,9690	0,8026	3,99
	Alis;D2 _(j19)	OPS	9	8	197,22	498,62	0,9739	0,8553	4,34
	Alis;base	-	11	7	185,03	387,47	0,9783	0,9079	4,77
	Alis;base	OPS	11	7	155,85	355,09	0,9847	0,9196	5,67
	Alis;base;D1 _(j19)	-	14	8	167,65	206,34	0,9814	0,9706	5,16
	Alis;base;D1 _(j19)	OPS	14	8	127,94	190,56	0,9892	0,9735	6,85

nVL: número de variáveis latentes; *out*: *Outliers*; RMSEP: erro quadrático da previsão; RMSECV: erro quadrático médio de validação; r_v = correlação da validação cruzada; r_p = correlação da previsão; RPD: relação de desempenho do desvio. Alis=Alisamento; D1_(j21) = 1ª derivada com janela 21; D1_(j19) = 1ª derivada com janela 19; D2_(j21) = 2ª derivada com janela 21; base = correção da linha de base.

Para o modelo espectral na região do NIR foi obtido um valor médio de r_v e r_p de 0,9826 e 0,9695, respectivamente e um valor médio de RMSECV e RMSEP de 197,70 e 290,39; e para a região do MID foi obtido um valor médio de r_v e r_p de 0,9820 e 0,9269 com um valor médio de RMSECV e RMSEP de 163,21 e 315,57. Comparando os resultados dos modelos, observa-se que os algoritmos de pré-processamento não

melhoraram significativamente os resultados da determinação de antocianinas totais. Apesar dos elevados valores de correlação (r_v e r_p) os valores de RMSECV foram elevados, sendo a média cerca de 9 vezes superior ao valor mínimo determinado pelo método referência ($18,13 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Isso indica que o método apresentado não é capaz de determinar antocianinas totais em soluções muito diluídas, mas sugere ser capaz de determinar em concentrações maiores que $214 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ em espectros MID, pois após remoção das amostras de concentrações baixas (Tabela 2, material suplementar) o erro médio foi de 31,76%, bem menor que os demais modelos construídos.

Tabela 3 – Resultados preditivos de polifenóis totais ($\text{mg AGE}\cdot\text{L}^{-1}$) dos extratos de uva violeta usando espectroscopia infravermelho e PLS

	Pré-processamento	Seleção de variáveis	nVL	out	RMSECV	RMSEP	r_v	r_p	RPD
NIR	Alisamento	-	7	8	153,10	238,35	0,9902	0,9804	7,13
	Alisamento	OPS	7	8	143,62	320,60	0,9914	0,961	7,61
	Alis;D1 _(j23)	-	6	8	204,72	299,77	0,9812	0,9669	5,12
	Alis;D1 _(j23)	OPS	6	8	175,79	280,12	0,9861	0,9708	5,97
	Alis;D2 _(j23)	-	5	7	282,41	321,78	0,967	0,9627	3,81
	Alis;D2 _(j23)	OPS	5	7	247,75	340,41	0,9748	0,9595	4,43
	Alis;base	-	7	7	214,74	158,07	0,9805	0,9924	5,04
	Alis;base	OPS	7	7	166,81	314,51	0,9883	0,9727	6,51
	Alis;base;D _(j23)	-	6	8	211,09	322,93	0,9802	0,9626	4,96
	Alis;base;D1 _(j23)	OPS	6	8	176,99	307,32	0,9861	0,9658	5,98
MID	Alisamento	-	12	8	136,41	310,95	0,9919	0,9956	7,88
	Alisamento	OPS	12	8	121,41	281,98	0,9936	0,996	8,85
	Alis;D1 _(j11)	-	10	7	164,63	396,90	0,9878	0,9477	6,40
	Alis;D1 _(j11)	OPS	10	7	144,00	332,60	0,9907	0,9607	7,35
	Alis;D2 _(j11)	-	10	10	169,71	415,01	0,9873	0,9419	6,27
	Alis;D2 _(j11)	OPS	10	10	147,25	410,45	0,9905	0,9427	7,22
	Alis;base	-	11	5	155,72	309,58	0,9893	0,9676	6,82
	Alis;base	OPS	11	5	145,38	322,92	0,9907	0,9626	7,32
	Alis;base;D1 _(j11)	-	10	7	161,01	398,97	0,9884	0,9473	6,55
	Alis;base;D1 _(j11)	OPS	10	7	145,86	368,01	0,9905	0,9522	7,24

nVL: número de variáveis latentes; out: *Outliers*; RMSEP: erro quadrático da previsão; RMSECV: erro quadrático médio de validação; r_v = correlação da validação cruzada; r_p = correlação da previsão; RPD: relação de desempenho do desvio. AGE: ácido gálico equivalente. Alis=Alisamento; D1_(j23) = 1ª derivada com janela 23; D2_(j23) = 2ª derivada com janela 23; D1_(j11) = 1ª derivada com janela 11; D2_(j11) = 2ª derivada com janela 11; base = correção da linha de base.

Comparando o resultado dos modelos, observa-se que os algoritmos de pré-processamento também não foram capazes de melhorar significativamente os resultados da determinação de polifenóis totais, pois apesar dos valores de correlação (r_v e r_p) e RDP estarem satisfatórios os valores de RMSECV e RMSEP apresentam-se elevados. Os

valores de RMSECV médio foi de 197,70 e 279,14 para os espectros NIR e MID, respectivamente, sendo cerca de 3-4 vezes superior ao valor mínimo determinado pelo método referencia ($71,68 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Isso indica que o método apresentado não é capaz de determinar polifenóis totais em soluções muito diluídas, mas sugere ser capaz de determinar em concentrações maiores que $216 \text{ mg AGE} \cdot \text{L}^{-1}$, pois após remoção das amostras de concentrações baixas (Tabela 3 e 4, material suplementar) o erro médio foi de 22,93 e 18,58% ,76%, para espectros NIR e MID, respectivamente.

Os modelos para antocianinas e polifenóis totais foram testados removendo-se as amostras de baixa concentração na previsão (material suplementar), porém os parâmetros da previsão (RMSEP, erro médio e RPD) não foram melhorados. O erro médio para antocianinas e polifenóis totais mantiveram-se superiores a 30% e 19%, respectivamente, não sendo considerados modelos confiáveis (Ferreira, 2015).

Tabela 4 – Resultados preditivos de capacidade antioxidante ($\mu\text{M trolox} \cdot \text{mL}^{-1}$), pelo radical DPPH, dos extratos de uva violeta usando espectroscopia infravermelho e PLS

	Pré-processamento	Seleção de variáveis	nVL	out	RMSECV	RMSEP	r_v	r_p	RPD
NIR	Alisamento	-	6	8	0,73	2,81	0,9867	0,837	6,12
	Alisamento	OPS	6	8	0,52	1,54	0,9932	0,9607	8,57
	Alis;D1 _(j23)	-	7	8	0,75	1,56	0,9853	0,9545	5,79
	Alis;D1 _(j23)	OPS	7	8	0,56	1,83	0,9918	0,9497	7,83
	Alis;D2 _(j23)	-	9	8	1,03	2,07	0,9728	0,915	4,25
	Alis;D2 _(j23)	OPS	9	8	0,82	1,92	0,9828	0,9296	5,33
	Alis;base	-	6	9	0,56	1,57	0,9916	0,9536	7,69
	Alis;base	OPS	6	9	0,44	1,95	0,9949	0,9347	9,91
	Alis;base;D _(j23)	-	7	8	0,66	1,95	0,9886	0,9402	6,61
	Alis;base;D1 _(j23)	OPS	7	8	0,61	2,33	0,9904	0,9306	7,19
MID	Alisamento	-	11	7	0,41	0,71	0,9958	0,9965	10,92
	Alisamento	OPS	11	7	0,39	0,65	0,9962	0,997	11,42
	Alis;D1 _(j17)	-	6	7	0,49	1,00	0,9941	0,9968	9,17
	Alis;D1 _(j17)	OPS	6	7	0,43	0,91	0,9954	0,9964	10,45
	Alis;D2 _(j17)	-	7	6	0,52	0,96	0,9931	0,9963	8,51
	Alis;D2 _(j17)	OPS	7	6	0,48	0,89	0,9942	0,9966	9,31
	Alis;base	-	10	6	0,41	0,69	0,9957	0,9962	10,76
	Alis;base	OPS	10	6	0,39	0,68	0,996	0,9966	11,27
	Alis;base;D1 _(j17)	-	13	6	0,46	0,77	0,9947	0,9971	9,70
	Alis;base;D1 _(j19)	OPS	13	6	0,39	0,63	0,9962	0,9968	11,46

nVL: número de variáveis latentes; out: *Outliers*; RMSEP: erro quadrático da previsão; RMSECV: erro quadrático médio de validação; r_v = correlação da validação cruzada; r_p = correlação da previsão; RPD: relação de desempenho do desvio. Alis=Alisamento; D1_(j23) = 1ª derivada com janela 23; D2_(j23) = 2ª derivada com janela 23; D1_(j17) = 1ª derivada com janela 17; D2_(j17) = 2ª derivada com janela 17; base = correção da linha de base.

Comparando o resultado dos modelos, observa-se que os modelos construídos com espectros na região MID apresentaram melhores valores de correlação (r_v e r_p) e RDP e que o valor de RMSECV são próximos ao valor mínimo determinado pelo método referência ($0,35 \mu\text{M trolox}\cdot\text{mL}^{-1}$), sendo que os modelos construídos com a seleção de variáveis OPS apresentaram os menores valores de RMSECV e RMSEP.

Os modelos com os espectros NIR apresentaram-se inadequados e com elevados erros, mesmo desconsiderando as amostras de baixa concentração (Tabela 5, material suplementar). O erro relativo médio dos espectros MID, considerando todas as amostras, foi elevado ($>12\%$), sendo isto resultado das amostras de baixa concentração (Tabela 6, material suplementar). Ao desconsiderando as amostras com os erros mais elevados (as três concentrações mais baixas) o erro médio das propriedades torna-se menor, evidenciando que o modelo não se aplica a amostras de baixa concentração.

Dykes *et al.* (2014) também relatou baixa precisão nas previsões das amostras de baixas concentrações ao trabalhar com sorgo, medindo taninos condensados e antocianinas, os quais pertencem ao grupo dos compostos fenólicos e apresentam capacidade antioxidante.

Os pré-processamentos que resultaram nos melhores modelos dos espectros MID foram reconstruídos desconsiderando as amostras de baixas concentrações. Na Tabela 5 observa-se os parâmetros dos modelos, ao trabalhar com valores de capacidade antioxidante (pelo DPPH) entre $1,3 - 15,97 \mu\text{M trolox}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Tabela 5 – Parâmetros dos modelos de capacidade antioxidante pelo DPPH dos extratos de uva violeta usando espectroscopia infravermelho na região MID, na faixa de $1,3 - 15,97 \mu\text{M trolox}\cdot\text{mL}^{-1}$

Pré-processamento	Seleção de variáveis	nVL	out	RMSECV	RMSEP	r_v	r_p	RPD	%E
Alisamento	-	11	5	0,40	0,69	0,9953	0,9963	10,41	8,92
Alisamento	OPS ₍₆₃₅₎	11	5	0,36	0,62	0,9961	0,9956	11,42	7,65
Alis;Base	-	11	5	0,40	0,67	0,9954	0,9964	10,45	6,89
Alis;Base	OPS ₍₇₃₀₎	11	5	0,37	0,65	0,9961	0,9947	11,35	6,03
Alis;Base;D1 _(j17)	-	11	5	0,46	0,87	0,9936	0,9940	8,88	11,07
Alis;Base;D1 _(j17)	OPS ₍₇₅₀₎	11	5	0,39	0,63	0,9955	0,9960	10,55	5,24

nVL : número de variáveis latentes; out : *Outliers*; RMSEP: erro quadrático da previsão; RMSECV: erro quadrático médio de validação; r_v = correlação da validação cruzada; r_p = correlação da previsão; RPD: relação de desempenho do desvio; %E = erro médio; OPS: Seleção de preditores ordenados, com o número de variáveis selecionadas. Alis=Alisamento; D1_(j17) = 1ª derivada com janela 17; base = correção da linha de base.

Nota-se que o pré-processamento mais eficiente foi o alisamento associado com a correção da linha de base e 1ª derivada (janela 17). Este modelo pôde prever bem a capacidade antioxidante nos extratos de uva violeta, uma vez que o erro médio está abaixo de 10%, a correlação está alta ($r_p > 0,99$) e RMSEP está próximo a concentração da menor amostra. A descrição dos erros das amostras de previsão pode ser visualizada na Tabela 6.

Tabela 6 – Valores preditos pelos modelos do espectro MID para capacidade antioxidante ($\mu\text{M trolox}\cdot\text{mL}^{-1}$), pelo radical DPPH e seus respectivos erros relativos (%), na faixa de 1,3 – 15,97 $\mu\text{M trolox}\cdot\text{mL}^{-1}$

Ref.	Modelo completo						Modelo OPS					
	Alis		Alis;Base		Alis;base;D1		Alis		Alis;Base		Alis;base;D1	
	Pred.	%E	Pred.	%E	Pred.	%E	Pred.	%E	Pred.	%E	Pred.	%E
1,41	1,71	21,12	1,54	-9,02	1,02	28,23	1,71	-20,64	1,44	-1,63	1,44	-1,54
12,20	13,62	11,68	13,67	-12,06	14,49	-18,82	13,31	-9,17	13,26	-8,73	13,36	-9,58
11,32	11,87	-4,89	11,85	-4,75	11,87	-4,87	11,56	-2,16	11,41	-0,83	11,47	-1,38
3,97	3,95	0,46	3,97	-0,12	4,04	-1,89	4,03	-1,61	4,07	-2,62	4,01	-1,01
5,66	5,69	-0,52	5,59	1,20	5,94	-5,02	5,29	6,52	5,39	4,72	5,21	7,98
12,27	13,11	-6,78	12,92	-5,29	12,68	-3,29	12,91	-5,15	13,02	-6,08	13,09	-6,67
12,18	11,98	1,64	12,03	1,16	12,47	-2,42	11,88	2,47	11,68	4,05	12,03	1,18
3,93	4,51	14,84	4,52	-14,97	4,75	-21,02	4,41	-12,28	4,45	-13,37	4,42	-12,42
2,01	2,26	12,74	2,23	-10,97	2,44	-21,39	2,12	-5,66	2,20	-9,78	2,07	-2,93
12,94	14,23	-9,99	14,18	-9,63	14,11	-9,10	14,31	-10,62	14,45	-11,68	14,31	-10,63
1,92	2,18	13,48	2,04	-6,61	1,81	5,68	2,07	-7,87	1,97	-2,90	1,87	2,32
M1	8,92		6,89		11,07		7,65		6,03		5,24	

Ref. e Pred. são as concentrações de referência e preditas ($\mu\text{M trolox}\cdot\text{mL}^{-1}$); %E: Erros relativos. M₁: erro médio relativo. Alis=Alisamento; Base= correção da linha de base; D1= 1ª derivada com janela 17.

Nota-se que ao se aplicar alisamento associado com a correção da linha de base e 1ª derivada (janela 17), com a seleção de variáveis (OPS), os erros individuais das amostras foram os menores, resultando no menor erro relativo médio. Isto evidencia que o modelo consegue prever com bom desempenho a capacidade antioxidante, pelo DPPH, de amostras na faixa modelada (1,3 – 15,97 $\mu\text{M trolox}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Não foi possível gerar modelos confiáveis para antocianinas e polifenóis totais mesmo em concentrações mais elevadas destas propriedades. Alguns autores também relataram algumas propriedades não modeladas ao aplicar espectros infravermelho e métodos quimiométricos: Manley, Joubert e Botha, (2006) não conseguiram bons modelos para fenólicos totais e capacidade antioxidante ao trabalhar com em roibos verde (*Aspalathus linearis*), e relataram que a falta de modelagem era provavelmente

devido à baixa concentração destes compostos. Martelo-Vidal e Vázquez (2014) ao trabalhar com 39 vinhos tintos (de duas origens: Rias baixa e Ribeira sacra) observaram que dependendo da origem, alguns compostos não puderam ser detectado e quantificados por UV-VIS-NIR. Essa diferença foi justificada pela origem das uvas, pois matérias provenientes de diferentes regiões apresentam diferentes condições climáticas e topográficas permitindo vinhos com espectros diferentes, onde na região do Ribeira sacra não foi possível obter modelos confiáveis para os compostos fenólicos. Na quantificação de compostos fenólicos ($r_c=0,93$) e capacidade antioxidante pelo DPPH ($r_c=0,87$) em vinhos Moscatel empregando MID, apesar da alta correlação na calibração, apresentaram menores correlações na previsão dos compostos fenólicos ($r_p=0,76$) e capacidade antioxidante pelo DPPH ($r_p=0,61$), mostrando que o modelo não prever bem estas propriedades (Silva et al., 2014).

O alto coeficiente de correlação (r_v e r_p) e RDP satisfatórios encontrados no presente trabalho pode significar que é possível a quantificação das propriedades, talvez não para todas as concentrações testadas, como foi mostrado para capacidade antioxidante pelo DPPH. Estes resultados não satisfatórios podem ser atribuídos ao fato de que ao se aumentar a concentração do extrato (do analito) os espectros se comportavam levemente diferentes, e que apesar da filtração e homogeneização alguns extratos apresentavam-se com precipitados dispersos no momento da leitura, o que pode ter influenciado a replicata do espectro apresentar-se com características diferentes.

É possível que estes modelos possam ser melhorados utilizando amostras recém extraídas e com uma faixa mais estreita. Este é um ponto que pode ser observado em estudos futuros, trabalhando-se apenas com as amostras mais concentradas, para evitar mudança no comportamento espectral ao se aumentar a concentração do extrato. Novos modelos foram construídos removendo-se as amostras de baixa concentração na calibração, porém os parâmetros não foram melhorados, e sendo por isso necessário realizar novo experimento. É interessante repetir o processo de obtenção dos extratos, com uma maior variação na obtenção das amostras e um menor intervalo de tempo entre obtenção do extrato, aquisição do espectro e análise de referência, de modo a evitar possíveis variações durante a armazenagem dos extratos.

4 CONCLUSÃO

Os algoritmos de pré-processamento não foram capazes de melhorar o resultado da determinação de antocianinas totais e compostos fenólicos totais, mesmo após a remoção das amostras de baixa concentração. Os modelos construídos apresentaram valores de correlação (r_v e r_p) e RDP satisfatórios, porém os valores de RMSECV, RMSEP e %E apresentaram-se elevados.

Ao trabalhar com valores de capacidade antioxidante (DPPH) entre 1,3 a 15,97 $\mu\text{M trolox}\cdot\text{mL}^{-1}$, e fazendo alisamento, correção da linha de base e 1ª derivada (janela 17), o modelo do espectro MID pode prever bem esta propriedade nos extratos de uva violeta. Sendo assim, o método com espectro MID foi eficiente para prever a capacidade antioxidante pelo DPPH.

5 REFERÊNCIAS

Apolo11 – Latitude e Longitude das cidades Brasileiras. Disponível em <apolo11.com> acesso em: 08.12.14.

BRASIL. **Resolução - RDC nº 34, de 9 de março de 2001** Brasil, 2001.

CONSTANT, P. B. L. **Extração, caracterização e aplicação de antocianinas de açaí (*Euterpe oleracea*, M .).** 183p. (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 2003.

DONG, W.; NI, Y.; KOKOT, S. A novel near-infrared spectroscopy and chemometrics method for rapid analysis of several chemical components and antioxidant activity of mint (*Mentha haplocalyx* briq.) samples. **Applied Spectroscopy**, v. 68, p. 245–254, 2014.

DYKES, L. *et al.* Prediction of total phenols , condensed tannins , and 3-deoxyanthocyanidins in sorghum grain using near-infrared (NIR) spectroscopy. **Journal of Cereal Science**, v. 60, p. 138–142, 2014.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria : Conceitos, Métodos e Aplicações.** Unicamp ed.Campinas, SP: 2015. 496p.

FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanins in cranberries. **Journal of Food Science**, v. 33, p. 72–77, 1968.

HAMERSKI, L.; REZENDE, M. J. C.; SILVA, B. V. Usando as Cores da Natureza para Atender aos Desejos do Consumidor: Substâncias Naturais como Corantes na Indústria Alimentícia. **Revista Virtual de Química**, v. 5, p. 394–420, 2013.

HOLLMAN, P. C. H. Unravelling of the health effects of polyphenols is a complex puzzle complicated by metabolism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 559, p. 100–105, 2014.

KENNARD, R. W.; STONE, L. A. Computer Aided Design of Experiments. **Technometrics**, v. 11, p. 137–148, 1996.

KIM, D.-O. *et al.* Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, p. 3713–7, 2002.

KRUGER, M. J. *et al.* Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. **Food Research International**, v. 59, p. 41–52, 2014.

LACHMAN, J.; HAMOUZ, K. Red and purple coloured potatoes as a significant antioxidant source in human nutrition - A review. **Plant, Soil and Environment**, v. 51, p. 477–482, 2005.

MANLEY, M.; JOUBERT, E.; BOTHA, M. Quantification of the major phenolic compounds, soluble solid content and total antioxidant activity of green rooibos (*Aspalathus linearis*) by means of near infrared spectroscopy. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 14, p. 213–222, 2006.

MARTELO-VIDAL, M. J.; VÁZQUEZ, M. Determination of polyphenolic compounds of red wines by UV – VIS – NIR spectroscopy and chemometrics tools. **Food Chemistry**, v. 158, p. 28–34, 2014.

MISITI, M. *et al.* **Wavelet Toolbox™ User's Guide How to Contact MathWorks** Natick MathWorks, 2015.

NORATTO, G. D. . *et al.* Anticarcinogenic effects of polyphenolics from mango (*Mangifera indica*) varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4104–4112, 2010.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 198–219, 2003.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. *et al.* Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods , oils and beverages : Extraction , measurement and expression of results. **Food Research Internationa**, v. 41, p. 274–285, 2008.

REBELLO, G. *et al.* Phenolic composition of the berry parts of hybrid grape cultivar BRS Violeta (BRS Rubea × IAC 1398-21) using HPLC – DAD – ESI-MS / MS. **Food Research International journal**, v. 54, p. 354–366, 2013.

SAURINA, J. Characterization of wines using compositional profiles and chemometrics. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, p. 234–245, 2010.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. Smoothing and differentiation by simplified least squares procedures. **Analytical Chemistry**, v. 36, p. 1627–1632, 1964.

SILVA, S. D. *et al.* Application of FTIR-ATR to Moscatel dessert wines for prediction of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 150, p. 489–493, 2014.

SINELLI, N. *et al.* Evaluation of quality and nutraceutical content in blueberries (*Vaccinium corymbosum*) by near and mid infrared spectroscopy. **Acta Horticulturae**, v. 810, p. 807–816, 2009.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–177, 1999.

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A. DE. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**, v. 55, p. 297–304, 2008.

TEÓFILO, R. F.; MARTINS, J. P. A.; FERREIRA, M. M. C. **OPS Toolbox 1.0**. Unicamp, Brasil, INPI - 0000270703255138, 2007.

TERESA, S. D. P. Molecular mechanisms involved in the cardiovascular and neuroprotective effects of anthocyanins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 559, p. 68–74, 2014.

WISE, B. M. *et al.* **PLS_Toolbox 4.2: for use with MATLAB**. Wenatchee: Eigenvector Research, Inc., 2006.

WU, D. *et al.* Application of near infrared spectroscopy for the rapid determination of antioxidant activity of bamboo leaf extract. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2147–2156, 2012.

XU, L. *et al.* Ensemble preprocessing of near-infrared (NIR) spectra for multivariate calibration. **Analytica Chimica Acta**, v. 616, p. 138–143, 2008.

YAMAGATA, K.; TAGAMI, M.; YAMORI, Y. Dietary polyphenols regulate endothelial function and prevent cardiovascular disease. **Nutrition**, v. 31, p. 28–37, 2015.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 1 – Valores preditos pelos modelos do espectro NIR com seleção de variáveis para antocianinas totais ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e seus respectivos erros relativos (%).

Ref.	Alis		Alis +D1		Alis +D2		Alis +base		Alis +base +D1	
	Pred.	%E	Pred.	%E	Pred.	%E	Pred.	%E	Pred.	%E
48,17	-53,56	211,20	-108,52	325,30	-297,55	717,74	-153,39	418,46	8,73	81,87
53,67	397,37	-640,44	114,20	-112,80	-150,88	381,16	331,53	-517,77	147,03	-173,98
93,86	112,43	-19,79	-204,65	318,04	-432,82	561,15	258,42	-175,34	-116,43	224,05
162,93	-34,33	121,07	-436,94	368,17	-191,83	217,73	-143,10	187,83	-241,67	248,33
214,66	654,88	-205,07	129,53	39,66	0,44	99,79	844,36	-293,34	64,29	70,05
225,56	332,56	-47,44	251,80	-11,63	91,18	59,58	-218,06	196,67	52,03	76,93
232,18	261,87	-12,79	127,19	45,22	-103,06	144,39	-11,61	105,00	-5,13	102,21
328,92	140,70	57,23	327,53	0,42	402,92	-22,50	158,26	51,88	311,42	5,32
429,33	747,65	-74,15	681,44	-58,72	597,12	-39,08	1437,13	-234,74	707,07	-64,69
509,47	35,84	92,97	598,71	-17,52	1422,20	-179,15	1063,19	-108,69	762,15	-49,60
577,39	563,95	2,33	479,98	16,87	1287,91	-123,06	513,08	11,14	494,82	14,30
703,92	592,34	15,85	566,10	19,58	215,23	69,42	715,69	-1,67	514,51	26,91
770,11	748,37	2,82	854,59	-10,97	956,85	-24,25	769,30	0,11	867,56	-12,65
2260,69	2563,00	-13,37	2701,81	-19,51	2715,15	-20,10	2663,29	-17,81	2725,70	-20,57
2377,80	2332,24	1,92	2380,41	-0,11	2346,56	1,31	2398,17	-0,86	2412,06	-1,44
M₁	<u>101,23</u>		<u>90,97</u>		<u>177,36</u>		<u>154,75</u>		<u>78,19</u>	
M₂	53,92		50,70		83,36		100,81		57,75	

Ref. e Pred. são as concentrações de referência e preditas; %E: Erros relativos. M₁: erro médio das 15 amostras externas; M₂: erro médio das 12 amostras externas (desconsiderando as 3 concentrações mais baixas). Alis=Alisamento; D1= 1ª derivada com janela 21; D2 = 2ª derivada com janela 21.

Tabela 2 – Valores preditos pelos modelos do espectro MID com seleção de variáveis para antocianinas totais ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e seus respectivos erros relativos (%).

Ref.	Alis		Alis +D1		Alis +D2		Alis +base		Alis +base +D1	
	Pred.	%E	Pred.	%E	Pred.	%E	Pred.	%E	Pred.	%E
48,17	36,76	23,69	36,89	23,40	116,12	-141,07	94,85	-96,91	26,47	45,05
53,67	-71,00	232,30	-136,96	355,21	-119,43	322,54	-111,44	307,65	-210,34	491,95
93,86	211,26	-125,09	288,05	-206,90	40,39	56,96	154,10	-64,19	178,45	-90,13
162,93	442,32	-171,47	265,33	-62,85	274,80	-68,66	349,50	-114,51	287,16	-76,25
214,66	479,42	-123,33	251,48	-17,15	640,03	-198,16	618,67	-188,20	236,24	-10,05
225,56	396,00	-75,56	342,50	-51,84	117,42	47,94	430,05	-90,66	315,15	-39,72
232,18	271,47	-16,92	294,86	-27,00	230,63	0,67	354,89	-52,85	270,14	-16,35
328,92	259,56	21,09	399,59	-21,48	616,43	-87,41	268,95	18,23	358,27	-8,92
429,33	1036,23	-141,36	833,88	-94,23	1381,42	-221,76	1256,30	-192,62	841,82	-96,08
509,47	945,33	-85,55	739,07	-45,07	1559,34	-206,07	1227,00	-140,84	931,01	-82,74
577,39	909,06	-57,44	625,29	-8,29	1660,35	-187,56	1202,98	-108,35	773,21	-33,91
703,92	608,98	13,49	815,13	-15,80	737,40	-4,76	691,22	1,80	760,35	-8,02
770,11	986,73	-28,13	974,39	-26,53	950,32	-23,40	801,07	-4,02	931,72	-20,98
2260,69	2122,68	6,10	2098,70	7,17	2205,09	2,46	2252,14	0,38	2169,35	4,04
2377,80	2420,00	-1,77	2466,46	-3,73	2470,53	-3,90	2469,56	-3,86	2509,35	-5,53
M₁	74,89		64,44		104,89		92,34		68,65	
M₂	61,85		31,76		87,73		76,36		33,55	

Ref. e Pred. são as concentrações de referência e preditas; %E: Erros relativos. M₁: erro médio das 15 amostras externas; M₂: erro médio das 12 amostras externas (desconsiderando as 3 concentrações mais baixas). Alis=Alisamento; D1= 1ª derivada com janela 19; D2 = 2ª derivada com janela 19.

Tabela 3 – Valores preditos pelos modelos do espectro NIR com seleção de variáveis para polifenóis totais ($\text{mg AGE}\cdot\text{L}^{-1}$) e seus respectivos erros relativos (%).

Ref.	Alis		Alis;D1		Alis;D2		Alis;base		Alis;base;D1	
	Pred.	%E	Pred.	%E	Pred.	%E	Pred.	%E	Pred.	%E
70,91	4,13	94,18	-167,61	336,36	-60,41	185,19	-79,07	211,50	-123,83	274,62
132,05	188,59	-42,81	-11,79	108,93	-130,23	198,62	126,90	3,90	-81,50	161,72
204,21	441,88	-116,39	475,90	-133,05	-50,81	124,88	424,68	-107,96	434,36	-112,70
216,56	249,90	-15,40	141,15	34,82	647,03	-198,77	201,84	6,80	205,44	5,13
256,81	269,98	-5,13	334,12	-30,10	350,49	-36,48	137,58	46,43	459,88	-79,07
333,01	281,87	15,35	112,93	66,09	-200,80	160,30	137,28	58,77	137,31	58,77
396,74	498,26	-25,59	653,82	-64,80	697,19	-75,73	486,74	-22,69	747,41	-88,39
816,83	1640,04	-100,78	738,52	9,59	1071,20	-31,14	831,43	-1,79	734,32	10,10
852,72	1015,78	-19,12	912,06	-6,96	780,49	8,47	1002,63	-17,58	906,78	-6,34
1130,66	1166,25	-3,15	1331,29	-17,75	1029,13	8,98	1034,52	8,50	1319,99	-16,75
1633,67	1304,99	20,12	1430,20	12,45	971,43	40,54	1217,11	25,50	1432,49	12,31
1837,88	1189,56	35,28	2688,61	-46,29	2505,74	-36,34	1067,97	41,89	2798,70	-52,28
2270,02	2574,43	-13,41	2143,87	5,56	2371,49	-4,47	1589,19	29,99	2244,21	1,14
3449,47	3244,74	5,94	3257,77	5,56	3471,09	-0,63	3151,14	8,65	3261,84	5,44
3689,07	3380,82	8,36	3510,94	4,83	3483,54	5,57	3656,62	0,88	3508,83	4,89
M₁		<u>34,73</u>		<u>58,88</u>		<u>74,41</u>		<u>39,52</u>		<u>59,31</u>
M₂		22,93		24,54		37,15		23,88		30,50

Ref. e Pred. são as concentrações de referência e preditas; %E: Erros relativos. M₁: erro médio das 15 amostras externas; M₂: erro médio das 12 amostras externas (desconsiderando as 3 concentrações mais baixas). Alis=Alisamento; D1= 1ª derivada com janela 23; D2 = 2ª derivada com janela 23.

Tabela 4 – Valores preditos pelos modelos do espectro MID com seleção de variáveis para polifenóis totais ($\text{mg AGE}\cdot\text{L}^{-1}$) e seus respectivos erros relativos (%).

Ref.	Alis		Alis;D1		Alis;D2		Alis;base		Alis;base;D1	
	Pred.	%E	Pred.	%E	Pred.	%E	Pred.	%E	Pred.	%E
70,91	-87,36	223,18	103,13	-45,43	74,71	-5,36	14,72	79,24	87,64	-23,58
132,05	283,05	-114,35	244,43	-85,10	76,96	41,72	227,94	-72,61	219,30	-66,07
204,21	48,57	76,22	28,48	86,06	53,18	73,96	92,16	54,87	72,83	64,34
216,56	313,67	-44,84	266,43	-23,03	338,53	-56,32	231,15	-6,73	248,91	-14,94
256,81	388,81	-51,40	392,32	-52,77	437,88	-70,51	420,00	-63,54	417,16	-62,44
333,01	284,82	14,47	280,07	15,90	390,55	-17,28	345,11	-3,63	271,79	18,38
396,74	405,59	-2,23	547,69	-38,05	623,67	-57,20	462,86	-16,67	494,16	-24,56
816,83	1084,12	-32,72	1193,46	-46,11	1371,79	-67,94	1219,90	-49,35	1247,66	-52,74
852,72	975,86	-14,44	946,93	-11,05	857,31	-0,54	1020,17	-19,64	923,95	-8,35
1130,66	1107,41	2,06	1154,27	-2,09	1095,14	3,14	1152,24	-1,91	1132,05	-0,12
1633,67	2162,02	-32,34	2258,73	-38,26	2375,21	-45,39	2299,66	-40,77	2342,98	-43,42
1837,88	2043,03	-11,16	2323,37	-26,42	2461,20	-33,92	2257,79	-22,85	2402,10	-30,70
2270,02	2303,07	-1,46	2695,06	-18,72	2976,38	-31,12	2589,04	-14,05	2797,76	-23,25
3449,47	3235,71	6,20	3322,70	3,68	3260,84	5,47	3242,78	5,99	3311,53	4,00
3689,07	2891,43	21,62	2918,41	20,89	2903,86	21,28	2945,71	20,15	2878,78	21,96
M₁	43,25		34,24		35,41		31,47		30,59	
M₂	19,58		24,75		34,18		22,11		25,41	

Ref. e Pred. são as concentrações de referência e preditas; %E: Erros relativos. M₁: erro médio das 15 amostras externas; M₂: erro médio das 12 amostras externas (desconsiderando as 3 concentrações mais baixas). Alis=Alisamento; D1= 1ª derivada com janela 11; D2 = 2ª derivada com janela 11.

Tabela 5 – Valores preditos pelos modelos do espectro NIR com seleção de variáveis para capacidade antioxidante ($\mu\text{M trolox}\cdot\text{mL}^{-1}$), pelo radical DPPH e seus respectivos erros relativos (%).

Ref.	Alis		Alis;D1		Alis;D2		Alis;base		Alis;base;D1	
	Pred.	%E	Pred.	%E	Pred.	%E	Pred.	%E	Pred.	%E
0,31	-0,03	108,08	-0,06	118,70	-0,07	122,58	-0,56	281,11	-0,26	183,50
0,66	0,67	-1,63	0,80	-20,59	-0,84	227,23	0,78	-18,99	0,07	88,79
0,89	0,94	-4,99	1,19	-33,88	2,65	-196,91	1,12	-26,06	1,05	-17,34
1,30	1,81	-39,23	0,99	23,51	2,65	-104,12	0,74	42,90	1,59	-22,32
1,41	3,09	-118,53	4,96	-250,41	1,31	7,17	3,70	-161,59	4,56	-222,50
1,92	1,86	2,83	1,90	1,09	0,05	97,59	1,37	28,40	2,17	-13,06
2,01	2,38	-18,43	2,56	-27,52	3,25	-62,11	1,21	39,89	2,99	-48,73
3,93	4,82	-22,68	3,64	7,37	4,86	-23,77	4,51	-14,87	4,52	-14,96
3,97	4,20	-5,95	4,07	-2,45	2,51	36,87	4,39	-10,51	4,16	-4,71
5,66	7,53	-33,15	5,22	7,80	4,51	20,29	9,73	-72,00	4,24	25,06
11,32	7,82	30,92	7,45	34,13	5,67	49,90	8,45	25,33	7,37	34,92
12,18	12,12	0,48	15,44	-26,83	14,28	-17,31	9,72	20,15	18,35	-50,67
12,20	15,79	-29,51	14,59	-19,67	13,00	-6,63	16,18	-32,71	15,49	-27,00
12,27	13,67	-11,36	14,25	-16,07	13,58	-10,60	13,47	-9,72	13,88	-13,06
12,94	13,83	-6,92	14,21	-9,85	12,90	0,30	13,84	-7,02	13,60	-5,15
M₁	28,98		39,99		65,56		52,75		51,45	
M₂	25,52		36,65		30,23		38,38		41,80	

Ref. e Pred. são as concentrações de referência e preditas ($\mu\text{M trolox}\cdot\text{mL}^{-1}$); %E: Erros relativos. M₁: erro médio das 15 amostras externas; M₂: erro médio das 12 amostras externas (desconsiderando as 3 concentrações mais baixas). Alis=Alisamento; D1= 1^a derivada com janela 23; D2 = 2^a derivada com janela 23.

Tabela 6 – Valores preditos pelos modelos do espectro MID com seleção de variáveis para capacidade antioxidante ($\mu\text{M trolox}\cdot\text{mL}^{-1}$), pelo radical DPPH e seus respectivos erros relativos (%)

Ref.	Alis		Alis;D1		Alis;D2		Alis;base		Alis;base;D1	
	Pred.	%E	Pred.	%E	Pred.	%E	Pred.	%E	Pred.	%E
0,31	0,82	-162,87	0,67	-113,95	0,29	6,49	0,91	-193,42	1,02	-227,39
0,66	1,14	-72,60	0,96	-45,30	0,59	10,44	1,16	-75,56	1,13	-71,12
0,89	1,06	-18,56	1,28	-43,08	1,28	-43,62	1,10	-23,74	1,33	-48,64
1,30	1,61	-23,92	1,50	-15,41	1,27	1,82	1,67	-29,01	1,41	-8,55
1,41	1,29	9,05	0,97	31,46	1,09	22,91	1,27	10,53	1,36	3,70
1,92	1,83	4,37	1,72	10,29	1,84	3,90	1,88	1,74	1,72	10,47
2,01	2,00	0,34	2,42	-20,64	2,42	-20,60	1,99	1,03	2,16	-7,64
3,93	4,69	-19,42	4,70	-19,56	4,30	-9,37	4,66	-18,53	4,44	-12,93
3,97	3,92	1,11	4,04	-1,80	3,74	5,83	3,85	2,95	4,05	-1,98
5,66	5,89	-4,08	6,36	-12,33	6,45	-14,06	5,83	-3,02	5,64	0,34
11,32	11,90	-5,11	12,30	-8,73	12,38	-9,37	11,90	-5,19	11,56	-2,19
12,18	12,15	0,22	13,17	-8,16	13,23	-8,63	12,19	-0,14	12,32	-1,19
12,20	13,80	-13,16	14,79	-21,23	14,79	-21,28	13,97	-14,53	13,53	-10,93
12,27	13,03	-6,18	13,18	-7,36	13,37	-8,89	13,11	-6,84	12,86	-4,75
12,94	14,16	-9,43	13,92	-7,65	13,64	-5,47	14,11	-9,09	14,50	-12,12
M₁	23,36		24,46		12,85		26,35		28,26	
M₂	8,03		13,72		11,01		8,55		6,40	

Ref. e Pred. são as concentrações de referência e preditas ($\mu\text{M trolox}\cdot\text{mL}^{-1}$); %E: Erros relativos. M₁: erro médio das 15 amostras externas; M₂: erro médio das 12 amostras externas (desconsiderando as 3 concentrações mais baixas). Acima da linha tracejada estão as amostras de baixa concentração. Alis=Alisamento; D1= 1ª derivada com janela 17; D2 = 2ª derivada com janela 17.

CONCLUSÃO GERAL

Para determinação da capacidade antioxidante (CA) *in vitro* das antocianinas, os métodos ABTS_{TEAC} e DPPH_{TEAC} foram influenciados apenas pelos agentes antioxidantes, sendo o ABTS_{TEAC} preferido por não ter apresentado falta de ajuste. O método DPPH_{%Seq} pode ser utilizado, porém deve-se remover os ácidos orgânicos presentes. O método DPPH_{EC50} e FRAP não são indicados por apresentar muitos interferentes.

Foi possível construir modelos para predição rápida de antocianinas totais e monoméricas, polifenóis totais e capacidade antioxidante (pelo método DPPH e ABTS) no extrato de repolho roxo. Os modelos PLS-OPS, com a espectrometria NIR forneceram os melhores modelos para antocianinas monoméricas e capacidade antioxidante (ABTS e DPPH) e os modelos com espectros MID mais preditivos para antocianinas totais e polifenóis totais.

O modelo PLS-OPS com o espectro MID foi eficiente para prever a capacidade antioxidante (pelo radical DPPH) nos extratos de uva violeta. O modelo apresentou melhor desempenho em amostras mais concentradas (1,30-15,97 $\mu\text{M trolox}\cdot\text{mL}^{-1}$). Não foi possível construir modelos satisfatórios para predição rápida de antocianinas e polifenóis totais em extratos de uva violeta.