

Antocianas

Método de descoloração pelo SO₂ (Blouin)

Preparação de uma mistura contendo:

1 ml vinho + 1 ml de etanol 96% + 0,1% HCl

Dividir a mistura anterior em dois tubos:

Tubo 1: 10 ml da mistura + 4 ml de água

Tubo 2: 10 ml da mistura + 4 ml NaHSO₃ 15%

Medição da DO 520 do conteúdo de cada um dos tubos, sendo respectivamente DO1 e DO2

Por comparação com uma solução padrão de antocianas, a concentração é dada por:

$$\text{Antocianas (mg/l)} = (\text{DO1} - \text{DO2}) \times 875$$

1. PRINCÍPIO DO MÉTODO

A concentração de polifenóis totais nas amostras de efluentes é determinada por espectrofotometria de acordo com o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, através de um reagente de mesmo nome, constituído de ácido fosfotúngstico (H₃PW₁₂O₄₀) e de ácido fosfomolibdico (H₃PMo₁₂O₄₀), que ao oxidar os fenóis, se reduz a óxido de tungstênio (W₈O₂₃) e de molibdênio (Mo₈O₂₃), de cor azul.

2. MATERIAL

- Pipetador automático;
- Ponteira de 1,0 mL;
- Pipeta graduada de 10mL;
- Balão volumétrico de 10 mL;
- Papel alumínio.

3. REAGENTES

- Reagente Folin-Ciocalteu;
- Carbonato de Sódio 20% (Na₂CO₃).

4 BIOSSEGURANÇA

Uso de EPI(s)

EPI(s) - Uso de luvas de procedimento, guarda-pó, touca, máscara descartáveis, óculos de proteção.

5. DESCRIÇÃO

5.1 Procedimento

Diluir em um balão volumétrico de amostra 1:10, ou seja, coloca-se 1 mL de amostra e completa-se com água ultra filtrada. Em outro balão volumétrico de 10 mL serão pipetados 7,9 mL de água ultra filtrada em seguida adiciona-se 0,10 mL da amostra previamente diluída a 1:10, 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu, após três minutos será adicionado 1,5 mL de carbonato de sódio a 20%. Homogeneizar e posteriormente embalar com o papel alumínio, logo após, guardar em local escuro. Esperar por duas horas. Depois é feita a leitura em espectrofotômetro a 760 nm. O resultado apresentado deve ser multiplicado por dez, a fim de representar o valor verdadeiro de polifenóis totais presentes no efluente, já que este foi previamente diluído nesta proporção.

5.2 Expressão dos Resultados

O resultado é obtido pela equação $y=0,0026x-0,032$, onde x = concentração em mg/L de polifenóis totais expressos em equivalentes de catequina.

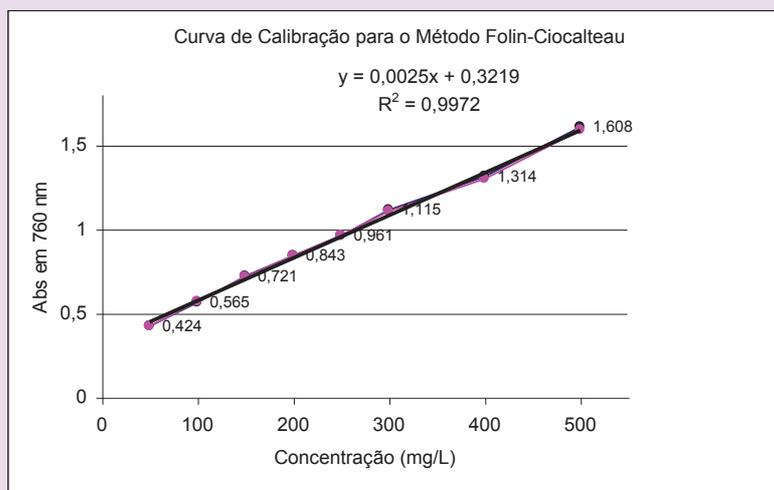


Figura 16 - Curva de padrão de polifenóis totais.

Antocianinas totais

1. PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método fundamenta-se no pH diferencial. A estrutura da molécula de antocianina é modificada pelo pH. Os valores de pH permitem determinar as três formas em diferentes pH.

2. MATERIAL

- Pipeta graduada de 5,0 mL;
- Pipeta graduada de 10 mL;
- Tubo de ensaio de 10 mL;
- Béquer de 50 mL.

3. REAGENTES

- Solução de Cloreto de potássio (0,025M) pH 1,0 (ajustar com ácido clorídrico)
- Solução de acetato de sódio (0,4M) pH 4,5 (ajustar com ácido clorídrico)

5.1 Procedimento

- Adicionar em um béquer 1,0 mL da amostra e 4ml de água destilada para diluição. Em um tubo de ensaio (A) colocar 1ml da amostra diluída e 4ml da solução tampão pH 1,0. Em outro tubo de ensaio (B) colocar 1ml da diluição da amostra e 4ml da solução tampão pH 4,5. Fazer duplicata cada tubo. Em seguida aguardar 20min e fazer a leitura em espectrofotômetro a 520nm e 700nm, tanto no tampão pH 1,0 quanto no de pH 4,5. A concentração da amostra em pH 1,0 deve apresentar leitura entre 0,2 e 1,4 AU, pois é o intervalo de linearidade do espectrofotômetro. A leitura a 700nm é realizada para descontar a turbidez da amostra. O cálculo da absorbância final é feito a partir da fórmula abaixo:

$$A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH1,0} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH4,5}$$

- A concentração total das antocianinas monoméricas foi expressa em cianidina-3-glicosídeo.
Antocianinas monoméricas (mg/100g) = $A \times PM \times FD \times 100 / (\epsilon \times 1)$
- Onde:
- A = Absorbância;
- PM = Peso molecular;
- FD = Fator de diluição e
- ϵ = Absortividade molar
- A concentração final de antocianinas (mg/100g) foi calculada com base no volume de extrato e peso da amostra (PM: 449,2 e ϵ : 26900).

Determinazione cromatografica

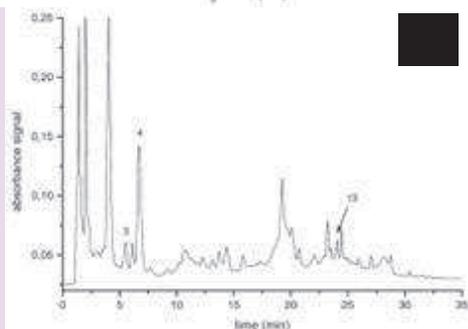
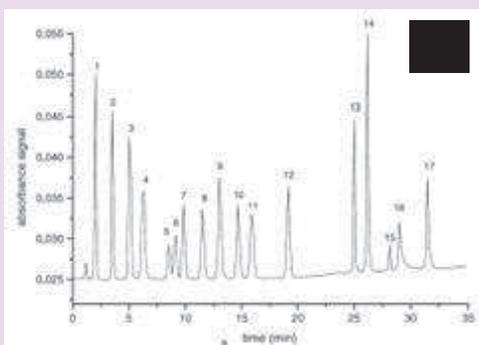
La determinazione dei singoli polifenoli è piuttosto complessa, in quanto non ci sono reazioni selettive che si possano sfruttare per effettuare ad esempio misure spettrofotometriche. La tecnica più idonea a determinare singolarmente i composti fenolici è la cromatografia, e in particolare, essendo i polifenoli composti non volatili, la tecnica HPLC

Esistono metodi di separazione HPLC che consentono di determinare un quadro polifenolico abbastanza ampio, anche se mai esaustivo: abbiamo visto come sotto la denominazione *polifenoli* rientrano in realtà composti piuttosto diversi, che dal punto di vista cromatografico hanno comportamento sicuramente differente. Per cui la separazione cromatografica è possibile per alcuni dei più importanti composti fenolici, generalmente impiegando metodi in gradiente, che consentono nella stessa corsa cromatografica di modificare le caratteristiche della fase mobile in modo da includere nella separazione famiglie diverse di polifenoli

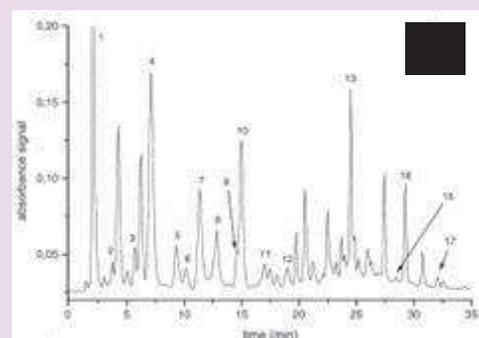
In alternativa, esistono metodi di pretrattamento che consentono di isolare una o più famiglie di polifenoli che possono essere poi determinate con maggiore accuratezza

Esempi di separazione di polifenoli

In questo esempio è riportato il cromatogramma di una miscela standard di polifenoli (A) separati su colonna C18 con una fase fissa acqua/metanolo/acido acetico in gradiente di metanolo. La rivelazione è spettrofotometrica a 280 nm



I polifenoli separati sono di tipo flavonoide e non flavonoide. Nel cromatogramma B è mostrata l'analisi di un vino rosso iniettato direttamente in colonna; il risultato migliora nettamente dopo estrazione liquido-liquido con dietilere (C). Si noti il picco del resveratrolo (13)

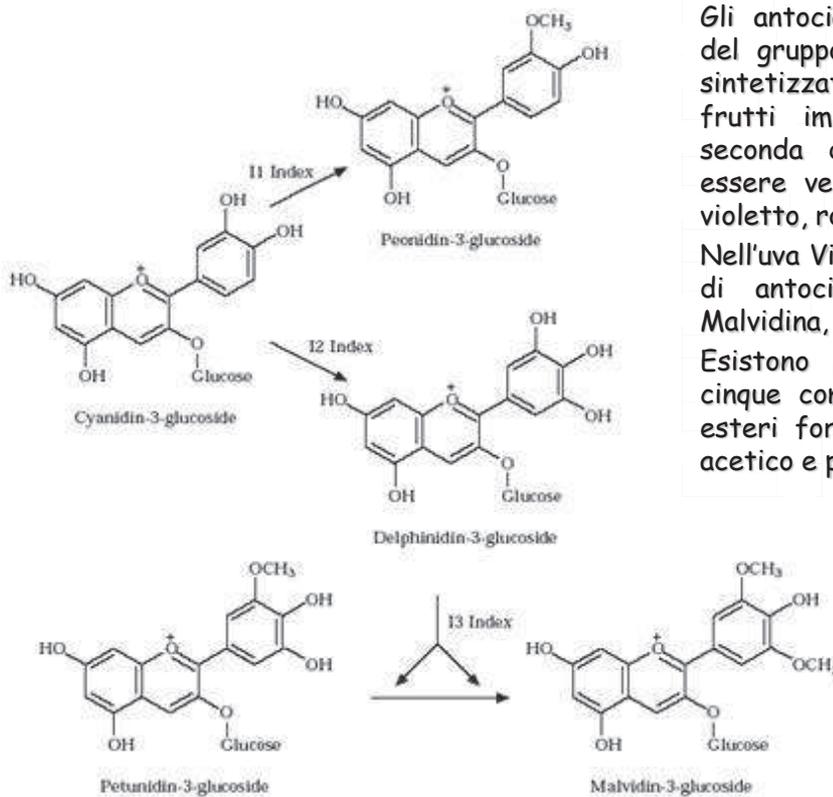


Gli antociani

Gli antociani sono composti polifenolici del gruppo dei flavonoidi. Essi vengono sintetizzati nelle bucce dell'uva, ai cui frutti impartiscono il colore che, a seconda degli antociani presenti, può essere verde-giallo, rosa, rosso, rosso-violetto, rosso-nero e blu-nero

Nell'uva *Vitis vinifera* esistono cinque tipi di antocianine: Cianidina, Delfinidina, Malvidina, Peonidina e Petunidina

Esistono poi alcuni derivati di questi cinque composti-base, in particolare gli esteri formati dal glucoside con l'acido acetico e p-cumarico



Equilibrio tra le forme

Gli antociani si trovano in strutture diverse a seconda del pH

