

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
CURSO BACHARELADO EM QUÍMICA

CLEYTON NASCIMENTO MAKARA

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS
PRESENTES NO BAGAÇO DE UVA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CURITIBA
2015

CLEYTON NASCIMENTO MAKARA

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS
PRESENTES NO BAGAÇO DE UVA**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Diplomação, do Curso Superior de Bacharelado em Química do Departamento Acadêmico de Química e Biologia – DAQBI – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de bacharelado.

Orientador: Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk

CURITIBA
2015

CLEYTON NASCIMENTO MAKARA

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES
NO BAGAÇO DE UVA**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de BACHAREL EM QUÍMICA pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI), do Câmpus Curitiba, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), pela seguinte banca examinadora:

Membro 1 – Profa. Dra. Poliana Macedo dos Santos
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Membro 2 – Profa. Dra. Danielle Caroline Schnitzler
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Orientador – Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Coordenadora de Curso – Profa. Dra. Danielle Caroline Schnitzler

Curitiba, 04 de dezembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por todas as oportunidades concedidas e pelas amizades que me proporcionou durante minha vida até a presente data.

À minha família, pelo amor e carinho que me oferecem e por sempre estarem me apoiando e incentivando em minhas escolhas e conquistas.

Aos meus pais Antônio e Solange e meus avós Sebastião e Ivone, que sempre me deram condições de estudar e sou grato pela oportunidade.

Ao meu orientador, professor Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk e a professora Dr^a. Giselle Maria Maciel por acreditarem em mim, pelo incentivo, amizade e dedicação, sempre presentes e pelo voto de confiança depositado.

Aos amigos e colegas ao decorrer da graduação, em especial Bruno Roberto Reis Alves e Everaldo Pedrosa Nahirny, grupo inseparável até ao final da graduação. Sou grato pelo conhecimento que o grupo sempre desenvolveu e pelas discussões construtivas e brincadeiras.

A amiga Rhaissa Dayane Cordeiro por estar tão presente na minha vida e ser atenciosa e querida, dando apoio do decorrer da graduação.

Aos amigos Mariana Emiko, Eduardo Teixeira Heyder e Ana Paula Stafussa pela companhia e risadas durante o decorrer do curso.

A minha ex orientadora Professora Dr^a Danielle Caroline Schnitzler, na qual tive contato no primeiro período da graduação e tive a oportunidade de trabalhar junto. Me incentivou nas pesquisas, e sou imensamente grato pela palavras de carinho, preocupação e conselhos durante o decorrer do curso.

Aos professores Dr^a Poliana Macedo dos Santos, Dr^a Erika Pereira Felix, Dr^a Larissa Kummer e Dr. Marcus Vinicius de Liz pela amizade, atenção e conhecimento compartilhado.

Pela amizade e companheirismo do amigo mestre Paulo Roberto Bairros e físico, onde sempre dividiu seu conhecimento e amizade na universidade e congressos e tornou a vontade de aprender e estudar maior ainda.

Aos professores do DAQBI pelo conhecimento transmitido e todos que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Dr^a Lucia Regina Rocha Martins pelo apoio e tempo cedido para o desenvolvimento e conclusão do trabalho.

À UTFPR, Fundação Araucária e ao CNPQ pelo financiamento dos projetos no qual atuei.

RESUMO

MAKARA, Cleyton N. Extração e caracterização de compostos bioativos presentes no bagaço de uva. 2015. Resumo de TCC – Bacharelado em Química Tecnológica, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

As indústrias de processamento de frutas geram elevados volumes de resíduos agroindustriais ricos em substâncias de alto valor nutricional e funcional. O Brasil vem se consolidando como um importante produtor mundial de vinho, gerando aproximadamente 20 % de resíduo na sua produção, como o bagaço. O objetivo deste estudo foi avaliar o bagaço de uva em função da presença de compostos fenólicos, flavonóides, antocianinas monoméricas e capacidade antioxidante. Extratos hidroetanólicos foram obtidos dos bagaços de uvas das variedades Bordo (BO), Cabernet Sauvignon (CS), Merlot (MT) e Tannat (TN). O conteúdo de fenólicos totais apresentou correlação direta com o teor de flavonóides e inversamente ao teor de antocianinas monoméricas. A variedade Cabernet Sauvignon ($3582,32 \pm 13,03$ mg GAE L⁻¹) apresentou o maior teor de fenólicos totais e teor de flavonóides ($2003,30 \pm 6,83$ mg EC L⁻¹). A variedade Tannat apresentou o teor mais elevado de resveratrol ($3,60 \pm 0,03$ mg 100g⁻¹), seguida da variedade BO ($2,40 \pm 0,10$ mg 100g⁻¹). O maior teor de antocianinas monoméricas foi obtido pela BO. Alguns compostos fenólicos foram quantificados por CLAE-DAD, sendo a catequina foi o composto mais abundante identificado no bagaço de uva para todas as variedades, seguido por ácido siríngico, teobromina e ácido vanílico.

Palavras chave: Bagaço de uva. Atividade antioxidante. Fenólicos totais.

Sumário

| | |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 7 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 9 |
| 3. OBJETIVOS | 10 |
| 3.1. Objetivo Geral..... | 10 |
| 3.2. Objetivo Específico | 10 |
| 4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 11 |
| 4.1. Uva | 11 |
| 4.2. Antioxidantes | 12 |
| 4.3. Compostos bioativos | 13 |
| 4.3.1. Compostos fenólicos..... | 15 |
| 4.3.2. Ácidos fenólicos | 15 |
| 4.3.3. Flavonóides..... | 17 |
| 4.3.4. Estilbenos | 19 |
| 4.4. Métodos analíticos..... | 19 |
| 4.4.1. Extração..... | 19 |
| 4.4.2. Compostos fenólicos totais | 20 |
| 4.4.3. Antocianinas monoméricas totais | 20 |
| 4.4.4. Antioxidantes | 21 |
| 4.4.5. Cromatografia líquida de alta eficiência | 22 |
| 5. METODOLOGIA | 24 |
| 5.1. Amostras | 24 |
| 5.2. Limpeza de materiais..... | 25 |
| 5.3. FTIR-ATR | 25 |
| 5.4. Obtenção do Extrato..... | 25 |
| 5.5. Análise dos compostos fenólicos totais (CFT)..... | 26 |
| 5.6. Análise dos flavonóides totais (TFC) | 27 |
| 5.7. Análise das antocianinas totais (TMA)..... | 29 |
| 5.8. Determinação da atividade antioxidante in vitro | 31 |
| 5.8.1. ABTS•+ (2,2'-azino-bis(ácido-3-etilbenzotiazoline-6-sulfônico)..... | 31 |
| 5.8.2. DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) | 32 |
| 5.8.3. Método de redução do Ferro (FRAP)..... | 33 |
| 5.9. Análise dos compostos fenólicos por CLAE-DAD | 34 |
| 5.10. Análises estatística | 36 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 37 |
| 6.1. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS | 49 |
| 7. CONCLUSÃO | 50 |
| 8. REFERÊNCIAS..... | 51 |

1. INTRODUÇÃO

As uvas são fruto da videira (*Vitis sp.*), uma planta da família das Vitaceae e existem aproximadamente 60 espécies, sendo a maioria encontrada nas zonas temperadas. São consideradas uma das frutas mais cultivadas e valiosas do mundo. É uma cultura trepadeira com tronco retorcido, ramos flexíveis, folhas grandes e repartidas em cinco lóbulos pontiagudos e flores esverdeadas em ramos. As uvas podem ser consumidas cruas ou serem usadas para elaboração de vinho, geléia, suco, passas entre outros, sendo que 80% são destinadas para a elaboração de vinho (Lago-Vanzela *et al.*, 2011; Rockenbach, Gonzaga, *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2015).

As indústrias de vinificação produzem milhões de toneladas de bagaço de uva (BU) todo ano. Estes bagaços são constituídos primordialmente por peles, sementes e caules. Devido á sazonalidade da produção da uva, esta provoca uma elevada concentração de resíduos em um curto período de tempo, causando impacto direto sobre os ambientes locais. O BU representa um problema de gestão de resíduos, tanto ecologicamente quanto economicamente. Assim, torna-se obrigatória a realização de estudos para este resíduo, a fim de obter destinos racionais, proporcionando o desenvolvimento de produtos com valor agregado (González-Centeno *et al.*, 2012; Barros *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2015).

Desta forma, uma abundante e diversificada quantidade de compostos fenólicos pode ser encontrada no BU. As cascas são constituídas principalmente por rutina, quercetina, resveratrol, flavonóis, ácidos fenólicos e as antocianinas, que dão ao BU as cores características. As sementes são compostas por catequinas, epicatequinas, ácido gálico, resveratrol e proantocianidinas, responsáveis pela sua adstringência (Banon *et al.*, 2007; Dani *et al.*, 2007; Iacopini *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2015). Porém, segundo Lago-Vanzela *et al.* (2011), o conteúdo e perfil de compostos fenólicos encontrados em diferentes uvas podem variar de acordo com a espécie, variedade, amadurecimento e às condições ambientais durante o cultivo.

Porém, na etapa de processamento da uva, vários fatores exercem influência na composição do BU, como as técnicas de processamento, pressão

de prensagem, temperatura e tempo de maceração (Lima *et al.*, 2015; Olejar, Fedrizzi e Kilmartin, 2015).

Compostos bioativos são substâncias não essenciais que atuam na manutenção da saúde humana. São de origem vegetal e atuam em alvos fisiológicos específicos, presentes nos vegetais para sua proteção (Liu, 2004; Bastos, Rogero e Areas, 2009).

Estudos demonstram que o consumo de compostos bioativos está associado a vários benefícios para a saúde, embora a biodisponibilidade e bioconversão de compostos fenólicos não foram ainda completamente elucidadas. Resultados na literatura sugerem que estes compostos, em particular os flavonóides, podem atuar como antioxidantes potentes, capazes de eliminação de radicais livres nas células. Estes flavonóides também participam na regeneração de outros antioxidantes, tais como vitamina E e ácido ascórbico, que protegem os constituintes celulares contra lesões oxidativas. Além disso, eles têm sido relatados como agentes quelantes de íons metálicos que são capazes de catalisar a peroxidação lipídica, juntamente com diversas atividades biológicas (antiestrogênios, doenças cardiovasculares, anti-inflamatório, anti-úlceras, anti-câncer, antimutagênico, antimicrobiano, antibacteriano e antifúngico) (Dani *et al.*, 2007; Bastos, Rogero e Areas, 2009; Xia *et al.*, 2010; Lago-Vanzela *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2015; Olejar, Fedrizzi e Kilmartin, 2015).

Compostos fenólicos da indústria agroindustrial têm recebido atenção considerável nos últimos anos por causa da ampla gama de possíveis aplicações. Uma das opções mais valiosas é a recuperação dos constituintes bioativos de plantas que têm propriedades antioxidantes e encontrar aplicações nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia (Fontana, Antonioli e Bottini, 2013).

2. JUSTIFICATIVA

A motivação para este projeto decorre da necessidade em que a sociedade atual se encontra em reaproveitar rejeitos industriais, anteriormente descartados, e aplica-los de forma consciente, reduzindo-se assim o impacto ambiental.

O interesse atual de consumidores e da comunidade científica em relação aos antioxidantes naturais tem aumentado, principalmente àqueles encontrados em frutas e vegetais, devido a estudos farmacológicos demonstrarem a associação entre o seu consumo e o baixo risco de doenças degenerativas.

Sabe-se dos benefícios do consumo consciente do vinho na saúde humana. A produção de vinhos gera uma grande quantidade de resíduos, e este atrelado aos seus constituintes bioativos, apresenta como fonte de compostos bioativos interessante aplicação tecnológica em alimentos, produtos farmacológicos e estéticos. Estudos demonstram a substituição de corantes e compostos alimentares antioxidantes sintéticos, estes de resultados dúbios em relação à segurança e efeitos futuros ao consumidor, por compostos naturais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar compostos bioativos majoritários (compostos fenólicos, flavonóides e antocianinas) e atividade antioxidante do extrato hidroetanólico do bagaço de uva da variedade Cabernet Sauvignon, Merlot e Tannat da espécie *Vitis vinífera* e uva da variedade Bordô da espécie *Vitis labrusca*.

3.2. Objetivo Específico

- Análise qualitativa do bagaço de uva através de FTIR-ATR para avaliar a presença de grupamentos funcionais;
- Avaliar procedimento de extração;
- Quantificar os compostos fenólicos totais, flavonóides e antocianinas monoméricas no extrato hidroetanólico do bagaço de uva através de técnicas colorimétricas;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato hidroetanólico através dos métodos de captura de radicais (ABTS, DPPH) e redução do íon ferro (FRAP);
- Quantificar os compostos fenólicos majoritários através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado ao detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD);

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1. Uva

Uvas são uma das frutas mais consumidas no mundo. Transformadas ou em sua forma natural, se destacam como fonte de compostos fenólicos, havendo cerca de 60 espécies, das quais a *Vitis labrusca* e *Vitis vinífera* são as mais difundidas e encontradas em zonas temperadas. No Brasil, os cultivares adaptaram-se melhor às condições climáticas temperadas do Sul, embora nos últimos anos, o seu cultivo em zonas do Brasil com clima mais perto de condições tropicais foi alcançado com sucesso (Ali *et al.*, 2010; Lago-Vanzela *et al.*, 2011; Rockenbach, Gonzaga, *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2015).

A variedade de uva Bordô, pertencente à espécie *Vitis labrusca*, é uma das variedades mais comuns relevantes no Brasil. A literatura científica sobre o conteúdo e perfil de compostos fenólicos nestas uvas e seus produtos derivados é extremamente escassa (Lago-Vanzela *et al.*, 2011).

A variedade Bordô, originalmente chamado Ives Mudas ou simplesmente Ives, foi obtido por Henry Ives em Cincinnati, OH, EUA, a partir de sementes da Hartford prolífico. Ela permite a preparação de sumos e a elaboração de vinhos com uma cor vermelha-púrpura intensa e aroma frutado, que pode ser consumido, ou utilizado em misturas com outras variedades. No entanto, um fator de limitação da maioria das *Vitis labrusca* é o seu baixo potencial para a produção de açúcar, quando comparada com cultivares da espécie *Vitis vinífera*. Uvas Bordô costumam atingir um teor de açúcar não superior a 16 ° Brix (escala numérica de índice de refração de uma solução, utilizada para determinar de forma indireta a quantidade de compostos solúveis numa solução de sacarose), tornando-se assim necessário adicionar sacarose (processo conhecido como chaptalização) para a elaboração de vinhos para que eles possam chegar ao teor alcoólico apropriado (Lago-Vanzela *et al.*, 2011).

As variedades Cabernet Sauvignon, Merlot e Tannat são pertencentes à espécie *Vitis vinífera* e originárias da França, destinadas principalmente para produção de vinhos. Pouco se sabe sobre a origem da variedade Merlot, mas foi cultivada na região de Bordeaux desde o século XVIII, amplamente cultivada na atualidade na Itália, Europa Central e América do Sul. Historicamente foi

usado para a mistura com Cabernet Sauvignon e outras variedades de Bordeaux para adicionar suavidade, reduzir os requisitos de envelhecimento e para cobrir o risco de amadurecimento. Nos últimos anos, se tornou popular como um vinho encorpado, de alta qualidade que pode ser comercializado mais cedo do que Cabernet Sauvignon (Christensen e Fidelibus, 2015).

A variedade Cabernet Sauvignon é cultivada amplamente na Europa Oriental, Austrália, Chile, Argentina, Brasil e Estados Unidos. Esta variedade é exclusivamente para produção de vinho de mesa seco de alta qualidade (Christensen et al., 2015). Apesar de sua proeminência no setor, esta variedade é relativamente nova e apresenta uma grande chance de ser produto do cruzamento entre Cabernet Franc e Sauvignon blanc durante o século 17, no sudoeste da França (Clarke e Rand, 2001). Sua popularidade é muitas vezes atribuída à sua facilidade de cultivo, pelas grossas, brotamento tarde para evitar a geada e resistente a riscos do setor vitivinícola, tais como podridão e insetos, características que expressam o caráter típico da variedade (Clarke e Rand, 2001).

Assim como a Cabernet Sauvignon, a variedade Tannat também é exclusivamente para produção de vinho de mesa seco de alta qualidade (TANNAT, 2015). Historicamente crescido no Sudoeste da França, é uma das variedades mais proeminentes no Uruguai, onde é considerada a "uva nacional", e hoje quase desconhecido na Europa. Foi introduzido por Pascual Harriague, um francês do País Basco, que plantou uma vinha dessa variedade, em 1870, a 400 km ao norte de Montevideú (Boido et al., 2003).

4.2. Antioxidantes

Os antioxidantes encontrados em alimentos são uma categoria heterogênea de compostos (Tuberoso *et al.*, 2013). São compostos ou sistemas que podem interagir com segurança com os radicais livres e cessar a reação em cadeia antes de moléculas vitais serem danificados (Oroian e Escriche, 2015).

Os antioxidantes apresentam capacidade quelação de íons metálicos que são capazes de catalisar a peroxidação lipídica, eliminar moléculas precursoras da peroxidação e prevenção da formação de peróxidos. Assim, os

antioxidantes (por exemplo, flavonóides e ácidos fenólicos, taninos, vitamina C, vitamina E) apresentam diversas atividades biológicas, tais como efeitos anti-inflamatórios, anti-cancerígenos, antiestrogênicos, anti-inflamatório, anti-úlceras, antimutagênico, antimicrobiano, antibacteriano e antifúngico (Dani *et al.*, 2007; Bastos, Rogero e Areas, 2009; Xia *et al.*, 2010; Lago-Vanzela *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2015; Olejar, Fedrizzi e Kilmartin, 2015; Oroian e Escriche, 2015).

4.3. Compostos bioativos

Com o aumento do conhecimento da utilização de aditivos em alimentos e a atenção que os alimentos funcionais têm adquirido nos últimos anos, há uma necessidade para a identificação de alternativas naturais e de fontes seguras, como a recuperação de compostos bioativos a partir de subprodutos agroindustriais (Fontana, Antonioli e Bottini, 2013).

Recentemente Yu e Ahmedna (2013) revisaram os componentes funcionais do BU com foco em sua composição, avaliando propriedades fenólicas, aspectos biológicos, antioxidantes e antimicrobianos. Estas características estão relacionadas com as características antioxidantes, como agentes redutores, inibindo assim a oxidação lipídica em diversos sistemas. Ao final do estudo, o BU apresentasse como uma valiosa fonte de fitoquímicos que podem ser recuperados como compostos funcionais para as indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia, bem como biopesticidas.

Revisão realizada por Oroian e Escriche (2015), apresentado na Tabela 1, associa as fontes naturais de antioxidantes e seus benefícios para a saúde em trabalhos realizados recentemente.

Tabela 1.
Fontes naturais de antioxidantes e seus benefícios para a saúde.

| Antioxidante | Fontes | Benefícios para a saúde |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Flavonols | <ul style="list-style-type: none"> • Bagaço de uva <i>Vitis vinifera</i> (Alcalde-Eon <i>et al.</i>, 2014; Liang <i>et al.</i>, 2014); • Chá verde (Bae <i>et al.</i>, 2015) • Vinho (Liang <i>et al.</i>, 2014) • Erva doce (Lu <i>et al.</i>, 2011) | Estudos têm mostrado que a quercetina, um flavonol, exibe propriedades anticâncer, antiinflamatória, antiviral, e pode também prevenir doenças cardiovasculares em humanos (Caridi <i>et al.</i> , 2007; Santos <i>et al.</i> , 2014) |
| Antocianinas | <ul style="list-style-type: none"> • Uvas, tomates, romã e cenouras roxa (Can, Arli e Atkosar, 2012) • Grãos de café verde (Cheong <i>et al.</i>, 2013) • Repolho vermelho (Wiczowski, Szawara-Nowak e Topolska, 2015) • Batata doce (Truong <i>et al.</i>, 2012) • Vinho (Can, Arli e Atkosar, 2012; Chen, S. <i>et al.</i>, 2015) | As antocianinas exibem atividade antioxidante e anticarcinogênica, desempenha um papel vital na prevenção de doenças cardiovasculares, neurais, câncer e diabetes (Tomas-Barberan e Andres-Lacueva, 2012; Santos-Buelga, Mateus e De Freitas, 2014). O potencial antioxidante depende da estrutura química da molécula, estrutura que dá propriedades antioxidantes à fenólicos (Pojer <i>et al.</i> , 2013). |
| Ácidos fenólicos | <ul style="list-style-type: none"> • Erva doce (Lu <i>et al.</i>, 2011) • Grãos de café verde (Cheong <i>et al.</i>, 2013) • Mostarda (Lu <i>et al.</i>, 2011) • Suco de laranja (Agcam, Akyildiz e Evrendilek, 2014) • Vinho (Mulero, Pardo e Zafrilla, 2010) | Os ácidos fenólicos são antioxidantes potentes e têm sido relatados por demonstrar atividade antibacteriana, antiviral, anticancerígenas, antiinflamatórios e vasodilatadores (Mudnic <i>et al.</i> , 2010; Lima <i>et al.</i> , 2014) |
| Estilbenos | <ul style="list-style-type: none"> • Amêndoas (Xie e Bolling, 2014) • Sementes e peles de uvas, vinho tinto (Mulero, Pardo e Zafrilla, 2010) | Os estilbenos ter: antioxidante e antimicrobiana eficiência prevenir a doença, arteriosclerose e cancro atuação cardiovascular e agir como agentes anti-inflamatórios e anti-virais (Galindo <i>et al.</i> , 2011; Frombaum <i>et al.</i> , 2012). |

4.3.1. Compostos fenólicos

No final do século 20, o interesse em compostos fenólicos alimentares tem aumentado devido à suas propriedades antioxidantes e capacidade de eliminação de radicais livres (Ahmed *et al.*, 2015; Oroian e Escriche, 2015)

Compostos fenólicos são fitoquímicos definidos pela presença de pelo menos um anel aromático com um substituinte hidroxil (fenol) ou mais (polifenóis), incluindo o seu derivado funcional (por exemplo, ésteres e glicosídeos) (Skinner e Hunter, 2013).

Um glicosídeo é definido como a ligação do grupo glicosilo e o grupo OR, chamado de ligação glicosídica, podendo esta ocorrer de quatro distintas maneiras de acordo com o tipo de átomo da aglicona que se une a uma glicona através de uma ligação glicosídica: O -, C -, N - e S - glicosídeos. Ligações do tipo O-glicosídeos, formadas a partir de um grupamento hidroxila da aglicona e outro da molécula de açúcar são as mais comuns (Dewick, 2002; Lupac, 2014).

Os compostos fenólicos contidos nas uvas em geral são classificados em três grupos: (1) ácidos fenólicos (ácido benzóico e hidroxicinâmico), (2) flavonóides (catequinas, flavonóis e antocianinas), e (3) taninos (Fontana, Antonioli e Bottini, 2013). Os compostos fenólicos mais abundantes no BU identificados compreendem às antocianinas, ácidos (hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos), flavan-3-ols, flavonóis e estilbenos (Rice-Evans, Miller e Paganga, 1996; Kammerer *et al.*, 2004).

4.3.2. Ácidos fenólicos

Duas classes de ácidos fenólicos podem ser distinguidas: derivados do ácido benzóico e derivados de ácido cinâmico. Os ácidos hidroxibenzóicos são componentes de estruturas complexas, tais como taninos hidrolisáveis e seu teor em plantas é muito baixa, com exceção do chá. Compreendem majoritariamente os ácidos gálico, siríngico e vanílico (Manach *et al.*, 2004).

Os ácidos hidroxicinâmicos são mais comuns e consistem principalmente de ácidos p-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico. Estes ácidos são derivados glicosilados ou ésteres de ácido quínico ou ácido tartárico. Ácido caféico e ácido quínico combinam-se para formar o ácido clorogênico. O ácido caféico é o mais abundante ácido fenólico e representa entre 75 % e 100 % do

teor de ácido hidroxicinâmico total em frutas, sendo encontrados em concentrações mais elevadas nas partes externas do fruto maduro. Ácido ferúlico é o mais abundante encontrado nas partes externas de grãos de cereais e representa até 90 % do total de polifenóis (Manach *et al.*, 2004).

Na Figura 1 e 2 estão apresentados respectivamente alguns ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos encontrados em BU.

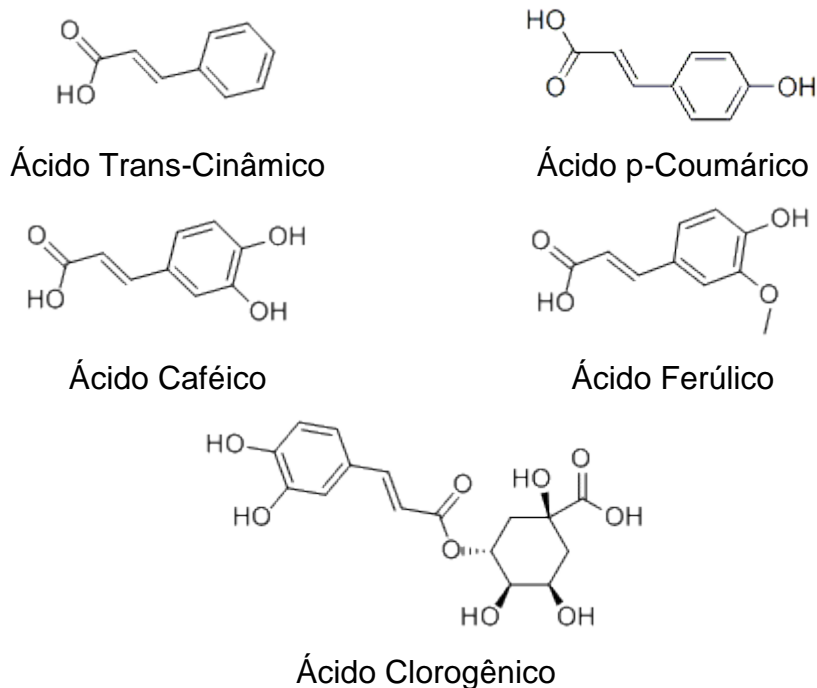


Figura 1. Estrutura de ácidos hidroxicinâmicos.

Fonte: http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB0158671_EN.htm

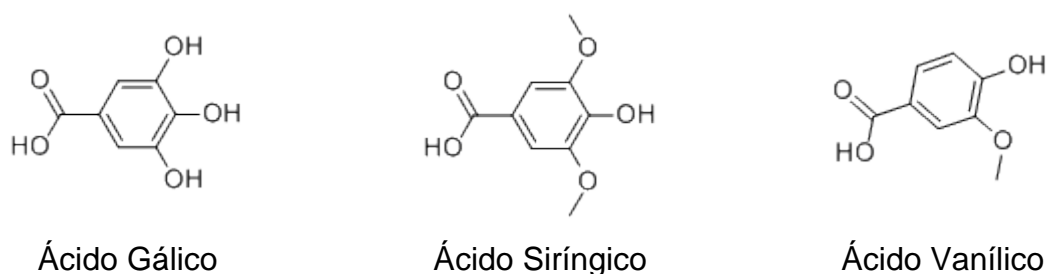


Figura 2. Estrutura de ácidos hidroxibenzóicos.

Fonte: http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB0158671_EN.htm

4.3.3. Flavonóides

Os flavonóides partilham de uma estrutura comum, que consiste em dois anéis aromáticos ligados por átomos de carbono que formam um heterociclo oxigenado. Eles são divididos em seis subclasses conforme função do tipo de heterociclo envolvido: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas e antocianidinas (catequinas e proantocianidinas) (Manach *et al.*, 2004).

Os flavonóides constituem uma grande classe de compostos, ubíquo em plantas, contendo um grande número de grupos hidroxilo. Eles ocorrem frequentemente na forma glicosídica. Polifenóis são multifuncionais e podem atuar como agentes redutores, antioxidantes, supressores de oxigênio singlete e em alguns casos propostos como agentes quelantes (Rice-Evans, Miller e Paganga, 1996).

Flavonóis estão presentes nos alimentos, e os principais representantes são quercetina e kaempferol, presentes em concentrações baixas e em formas glicosiladas. A porção de açúcar é muito frequentemente associada glicose ou ramnose, mas outros açúcares podem também estar envolvidos (por exemplo, galactose, arabinose, xilose, ácido glucurônico) (Manach *et al.*, 2004).

As isoflavonas apresentam semelhanças estruturais com estrogênios. Embora eles não sejam esteroides, confere-os propriedades pseudohormonal sobre eles, incluindo a capacidade de se ligar aos receptores de estrogênio, e que são classificadas como fitoestrógenos (Manach *et al.*, 2004).

As catequinas estão presentes em muitas frutas, sendo a catequina e epicatequina os principais flavonóis encontradas em certas sementes de leguminosas, uvas e chá verde (Manach *et al.*, 2004).

As proantocianidinas, conhecidos também como taninos condensados, são dímeros, oligômeros e polímeros de catequinas que estão ligadas entre si. Através da formação de complexos com proteínas, taninos condensados são responsáveis pelo caráter adstringente de frutas e bebidas (Manach *et al.*, 2004).

As antocianinas são pigmentos dissolvidos na seiva vacuolar dos tecidos epidérmicos de flores e frutas, para que eles conferem uma cor-de-rosa, vermelho, azul ou roxo. Eles existem em diferentes formas químicas,

tanto coloridos e sem cor, de acordo com o pH. Apesar de serem altamente instáveis, enquanto estiverem em plantas, eles são resistentes às condições de luz, pH, devido a glicosilação. Além disso, as antocianinas são estabilizadas pela formação de complexos com outros flavonóides (copigmentação). As antocianinas são encontradas no vinho tinto, certas variedades de cereais, e certas folhas e raízes vegetais (beringelas, couve, feijão, cebola, rabanete) (Manach et al., 2004).

Cianidina é uma antocianina mais comum em alimentos, geralmente proporcional à intensidade da cor, aumentando sua concentração à medida que o fruto amadurece. As antocianinas são encontradas principalmente na pele, com exceção de certos tipos de fruta vermelha, em que eles também ocorrem na polpa. No vinho contém 200 - 350 mg L⁻¹ e estas são transformadas em várias estruturas complexas conforme o vinho envelhece (Manach et al., 2004).

Os flavonóides, em particular a catequina, quercetina, kaempferol, flavonóis e os seus glicósidos são constituintes das bebidas verdes e chás preto e vinho tinto. Na Figura 3 apresentam-se alguns compostos de interesse e encontrados no BU (Rice-Evans, Miller e Paganga, 1996; Fontana, Antonioli e Bottini, 2013).

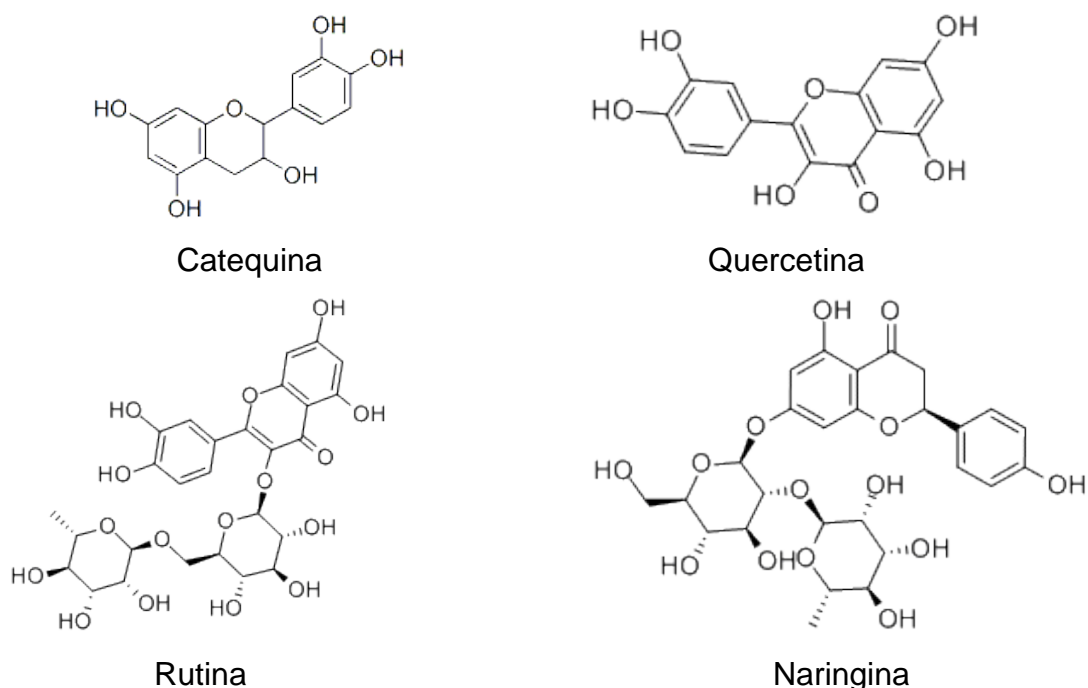
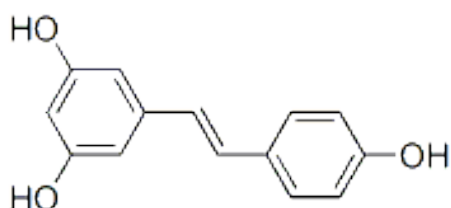


Figura 3. Estrutura de alguns flavonóis.

Fonte: http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB0158671_EN.htm

4.3.4. Estilbenos

Os estilbenos são encontrados apenas em baixas quantidades na dieta humana. Um destes, o resveratrol, estrutura representada na Figura 4, foram demonstrados através de estudos efeitos anticancerígenos durante o rastreio de plantas medicinais e que tem sido extensivamente estudada. No entanto, devido o resveratrol ser encontrado em pequenas quantidades na dieta, qualquer efeito protetor desta molécula é improvável de um consumo nutricional normal (Manach *et al.*, 2004).



Resveratrol

Figura 4. Estrutura do Resveratrol (estilbeno).

Fonte: http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB0158671_EN.htm

4.4. Métodos analíticos

Atualmente existem diversos métodos para a análise de antioxidantes, compostos fenólicos, flavonóides e antocianinas. Os métodos compreendem desde métodos simples, rápidos e baratos, como métodos colorimétricos. Mas há disponíveis métodos precisos e robustos, que envolvem a identificação e quantificação de diferentes substâncias, como a cromatografia.

4.4.1. Extração

Antes da quantificação, é necessária a extração dos diferentes compostos da matriz alimentar. Isso envolve o uso de solventes orgânicos, fluídos supercríticos, procedimentos de microondas, campos elétricos pulsados ou ultra-som (Drosou *et al.*, 2015; Oroian e Escriche, 2015).

Na literatura, o processo de extração de compostos bioativos é mencionado à utilização de metanol acidificado (Rockenbach, Rodrigues, *et al.*, 2011), soluções aquosas de 50 % (v/v) de metanol, 50 % (v/v) de etanol e

50 % (v / v) de acetona (Medouni-Adrar *et al.*, 2015), água:etanol (1:1) (Drosou *et al.*, 2015), hexano (Rockenbach *et al.*, 2008), solução hidroetanólica 80 % v / v (Tournour *et al.*, 2015), solução hidrometanólica 70 % acidificado 1 % HCl (Chen, P. X. *et al.*, 2015), solução aquosa de etanol 0, 30, 50, 70 e 100 % (v / v) (Rockenbach *et al.*, 2008) e solução aquosa de acetona 0, 30, 50, 70 e 100 % (v / v) (Rockenbach *et al.*, 2008).

4.4.2. Compostos fenólicos totais

Para quantificação de compostos fenólicos totais, na literatura apresentasse a análise espectral e a colorimétrica. A análise espectral baseia-se na região de 280 nm, onde substâncias fenólicas absorvem a luz UV. O problema deste método é que cada classe de substâncias fenólicas tem uma absorvidade diferente a 280 nm. Assim, os resultados não podem ser relacionados com qualquer padrão específico. O método é simples e rápido, necessitando apenas de filtração e, em alguns casos, a diluição. É muito adequado para monitoramento de vinhos durante várias fases de fermentação e para a comparação de vinhos semelhantes (Wrolstad *et al.*, 2001).

A análise colorimétrica de *Folin-Ciocalteu* de Singleton e Rossi (1965) é mais utilizado e amplamente adotado. O método colorimétrico baseia-se na redução química do reagente, uma mistura de óxidos de tungstênio e molibdênio. Os produtos da redução do óxido de metal tem uma cor azul que apresenta uma absorção de luz máxima a 765 nm. Este método foi adotado nos trabalhos de Spigno, Trarnelli e De Faveri (2007), Rockenbach, Gonzaga, *et al.* (2011), Antonioli *et al.* (2015), Chen, P. X. *et al.* (2015), Drosou *et al.* (2015), Iora *et al.* (2015^a), Medouni-Adrar *et al.* (2015) e Tournour *et al.* (2015), mas apresenta algumas interferências, como a presença de dióxido de enxofre, ácido ascórbico, açúcares e proteínas. O método de *Folin-Ciocalteu* é adotado como procedimento oficial (Wrolstad *et al.*, 2001). Os resultados são expressos em miligramas de ácido gálico (mg GAE).

4.4.3. Antocianinas monoméricas totais

Antocianinas tem um papel fundamental na qualidade da cor de muitas frutas, legumes frescos e transformados. Assim, a medida exata de

antocianinas, juntamente com os seus índices de degradação, é muito útil para avaliação da qualidade de alimentos crus e processados (Wrolstad *et al.*, 2001).

Antocianinas sofrem transformações estruturais reversíveis com uma alteração no pH, que se manifesta nos espectros de absorvância. Esta reação permite a medição precisa e rápida de informações quantitativas e qualitativas, mesmo na presença de pigmentos degradados polimerizados e outros compostos interferentes (Wrolstad *et al.*, 2001).

Trabalhos recentes utilizam este método, como os trabalhos realizados por Rockenbach *et al.* (2008), Rockenbach, Rodrigues, *et al.* (2011), Monrad *et al.* (2014) e Iora *et al.* (2015a).

4.4.4. Antioxidantes

O Primeiro Congresso Internacional sobre Métodos antioxidantes foi convocado em Orlando, em junho de 2004, para lidar com questões analíticas relativas à avaliação da capacidade antioxidante. Atualmente um grande número e variações de métodos para medir capacidade antioxidante estão disponíveis, não havendo um método predominante (Prior, Wu e Schaich, 2005).

O que impede de um ter método padrão, são as fontes de antioxidantes no sistema biológico. Existem (1) as enzimas (superóxido-dismutase, catalase); (2) grandes moléculas (albumina, ferritina, outras proteínas); (3) pequenas moléculas (ácido ascórbico, ácido úrico, tocoferol, carotenóides, (poli) fenóis); e alguns (4) hormônios (estrogênio, angiotensina, melatonina) (Prior, Wu e Schaich, 2005).

Assim como existem fontes de antioxidantes, existem várias fontes de radicais livres e oxidantes ($O_2^{\cdot-}$, 1O_2 , HO^{\cdot} , NO^{\cdot} , $ONOO^{\cdot}$). Os oxidantes e antioxidantes têm diferentes características químicas e físicas. Antioxidantes individuais podem, em alguns casos, atuar por mecanismos múltiplos num único sistema ou por um único mecanismo diferente, dependendo do sistema de reação. Além disso, os antioxidantes podem responder de uma forma diferente para diferentes fontes de radicais ou oxidantes (Prior, Wu e Schaich, 2005).

Não existe um método simples universal da AOC pelo qual pode ser medida com precisão e quantitativamente a atividade antioxidante. Como várias características e mecanismos estão envolvidos, não há um ensaio que reflita com precisão todas as fontes de radicais ou todos os antioxidantes num sistema misto ou complexo (Prior, Wu e Schaich, 2005).

Segundo Prior, Wu e Schaich (2005), a necessidade de métodos analíticos padronizados da AOC, permite orientação para a aplicação adequada de ensaios, comparações significativas de resultados de alimentos, controlar a variação dentro ou entre os produtos.

Os métodos *in vitro* são amplamente utilizados para mensurar a atividade antioxidante. Os métodos são divididos em Transferência de Átomo de Hidrogênio (HAT) e Transferência de um Elétron (SET) (Prior, Wu e Schaich, 2005). Na Tabela 2 estão presentes os métodos mais utilizados e suas respectivas fontes.

Tabela 2.
Métodos antioxidantes mais usados.

| Mecanismo | Método | Fontes |
|-----------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SET / HAT | ABTS (2,2'-azino-bis(ácido-3-etilbenzotiazoline-6-sulfônico)) | (Prior, Wu e Schaich, 2005; Thaipong <i>et al.</i> , 2006; Socorro Moura Rufino, M. D. <i>et al.</i> , 2007; Spigno, Trarnelli e De Faveri, 2007; Rockenbach, Rodrigues, <i>et al.</i> , 2011) |
| | DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) | (Prior, Wu e Schaich, 2005; Thaipong <i>et al.</i> , 2006; Socorro Moura Rufino, M. <i>et al.</i> , 2007b; Rockenbach, Gonzaga, <i>et al.</i> , 2011; Rockenbach, Rodrigues, <i>et al.</i> , 2011; Chen, P. X. <i>et al.</i> , 2015; Tournour <i>et al.</i> , 2015) |
| SET | FRAP (Poder antioxidante de redução do ferro) | (Prior, Wu e Schaich, 2005; Socorro Moura Rufino <i>et al.</i> , 2006; Thaipong <i>et al.</i> , 2006; Rockenbach, Gonzaga, <i>et al.</i> , 2011; Rockenbach, Rodrigues, <i>et al.</i> , 2011; Chen, P. X. <i>et al.</i> , 2015) |
| HAT | ORAC (Capacidade de absorção do radical oxigênio) | (Prior, Wu e Schaich, 2005; Thaipong <i>et al.</i> , 2006; Chen, P. X. <i>et al.</i> , 2015; Tournour <i>et al.</i> , 2015) |

4.4.5. Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia tem sido utilizada para análises mais detalhadas de componentes fenólicos em diversas matrizes, para análises quantitativas e/ou

qualitativas. A cromatografia líquida acoplada a arranjo de diodos e à espectrometria de massas foi utilizada como ferramenta de análise quantitativa de uma imensa gama de compostos fenólicos (Wang *et al.*, 2002).

A cromatografia líquida é dividida de acordo com a natureza da fase móvel, em fase normal e reversa, e de acordo com a eluição adotada, compreendendo em isocrática e gradiente (COLINS, 2006; LANÇAS, 2009).

O método mais difundido para compostos fenólicos é a análise cromatográfica de fase reversa com eluição gradiente. A coluna comumente utilizada é a C18, devido ao seu baixo custo, seletividade, elevada eficiência em partículas de 3 µm, 5 µm e 10 µm. Recomendada para análise de compostos polares e apolares, ácidos e bases ionizados e compostos que diferem em hidrofobicidade. Há em desenvolvimento colunas com partículas inferiores a 3 µm, mas existem barreiras a serem suplantadas, como confecção de bombas e sistema de pressurização que operem a elevadas pressões (LANÇAS, 2009).

As fases móveis descritas na literatura citam: (1) solvente A, água: tetrahydrofurano : ácido trifluoroacético (98: 2: 0,1) e solvente B, metanol : tetrahydrofurano : ácido trifluoroacético (98: 2: 0,1) operando em gradiente (Rockenbach, Rodrigues, *et al.*, 2011); (2) solvente A, água : ácido fórmico 90:10 (v / v), solvente B, metanol : água : ácido fórmico 50:40:10 (v / v) operando gradiente (Giacosa *et al.*, 2015); (3) solvente A, água : ácido fosfórico 1,0 % v / v e solvente B, metanol, operando gradiente (Iora *et al.*, 2015b).

5. METODOLOGIA

5.1. Amostras

As amostras de bagaço de uva das variedades Cabernet Sauvignon, Merlot e Tannat da espécie *Vitis vinífera* e uva da variedade Bordô da espécie *Vitis labrusca* foram concedidas pela UFPR, oriundo do processo de fabricação de vinhos, localizado na região de Toledo – PR, Brasil.

Todas as amostras foram submetidas ao processo de secagem em estufa de circulação de ar por 36 horas a temperatura de 40°C. Após a secagem, as amostras foram moídas em moinho de facas e acondicionadas em embalagens plásticas de polietileno de baixa densidade (PEBD) seladas a vácuo e ao abrigo da luz. As amostras foram armazenadas à -20°C em congelador até o momento das análises. Os bagaços estão apresentados na Figura 5.



Figura 5. Amostras das variedades de uva.

Fonte: Autor.

5.2. Limpeza de materiais

Para limpeza de materiais, foi utilizada a metodologia de limpeza básica de frascaria, conforme proposto por CETESB (Guia nacional de coleta e preservação de amostras, 2011). Os materiais de vidro e polietileno foram deixados em solução de detergente alcalino 0,1% por 24 horas. Após o tempo de molho, os materiais foram esfregados nas partes interna e externa para retirada de resíduos. O enxágue ocorreu com água corrente para retirada do detergente e realizou-se enxágue final com água deionizada, com posterior secagem a temperatura ambiente.

5.3. FTIR-ATR

Os espectros de infravermelho foram adquiridos com um espectrômetro FTIR (Varian 640-IR) equipado com um eixo horizontal de refletância total atenuada (ATR) de cristal de seleneto de zinco controlado por software Varian Pro, fornecido pela Varian Inc. Foram obtidos 3 varreduras por espectro com uma resolução espectral de 4 cm^{-1} número de onda no intervalo $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ nos extratos hidroetanólicos e no bagaço de uva.

5.4. Obtenção do Extrato

A extração dos compostos bioativos foi realizada com soluções hidroetanólicas com 20, 40, 60 e 80 % (v/v), na proporção soluto/solvente de 1:20 (w/v). Foi utilizado água ultrapura (Milli-Q, Millipore, São Paulo, SP, Brazil) e etanol PA. A extração ocorreu em uma incubadora shaker (Marconi, Mod. MA 420) a 25°C e 130 rpm durante 4 horas. Após a extração, a mistura foi centrifugada Quimis (Mod. Q-222-T28) e o sobrenadante (extrato) utilizado para quantificação de compostos fenólicos totais, flavonóides, antocianinas monoméricas, determinação da capacidade antioxidante e compostos fenólicos por CLAE.

5.5. Análise dos compostos fenólicos totais (CFT)

O conteúdo total de polifenóis em cada extrato será determinado espectrofotometricamente de acordo com o método colorimétrico Folin-Ciocalteu de Singleton e Rossi (1965) adotado por Iora *et al.* (2015a).

O reagente de *Folin-Ciocalteu* foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O reagente consiste de uma mistura de ácidos fosfotungstíco e fosfomolibdico (coloração amarelada) em um meio básico. Os fenóis contidos nas amostras são energeticamente oxidados em meio básico, resultando na formação do O^{2-} , o qual reage com os ácidos formando compostos (coloração azul) com uma intensa absorção em 765 nm. Os fenólicos determinados por CFT são frequentemente expressos em ácido gálico equivalente.

O ensaio CFT é um dos mais antigos métodos de quantificação de fenóis em uma amostra e conhecido como ensaio de fenóis totais. Foi desenvolvido inicialmente por Singleton e Rossi (1965) e em 1999 o ensaio foi delineado e padronizado para quantificação de fenóis totais (Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos, 1999).

O ensaio CFT atualmente é utilizado para mensurar a capacidade antioxidante de uma amostra o que aparentemente pode não estar refletido na sua característica de “ensaio de fenóis totais”. Porém, um crescente número de publicações está aplicando o ensaio de fenóis totais e um ensaio antioxidante baseado na transferência de elétrons (TEAC, FRAP, etc.) encontrando excelentes correlações lineares entre o perfil de fenóis totais e a atividade antioxidante.

O método CFT é caracterizado um ensaio indireto, pois o processo consiste em uma reação de oxirredução entre um oxidante e um antioxidante, baseados na transferência de elétrons, reduzindo o molibdênio e mudando a cor do meio reacional de amarelo para azul, conforme elucidado na Figura 6.

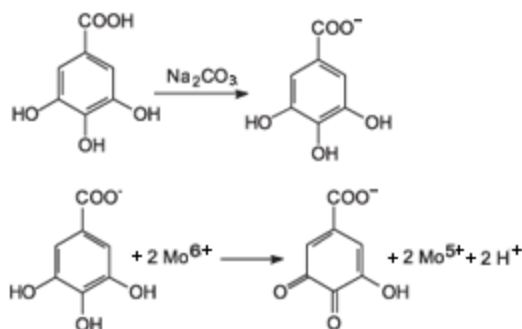


Figura 6. Reação entre ácido gálico e molibdênio.

Fonte: Autor.

A reação CFT ainda não está definida, mas é conveniente, simples e reprodutivo. Como resultado, uma grande massa de dados estão sendo acumulados através deste e está se tornando um ensaio rotineiro no estudo de antioxidantes fenólicos, uma vez que se estabeleceu uma correlação entre o conteúdo fenólico e a capacidade antioxidante de produtos naturais (Jayaprakasha *et al.*, 2007; Surveswaran *et al.*, 2007).

A reação será realizada através da alíquota de 0,1 mL da amostra diluída misturada com 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 2,0 mL de carbonato de sódio 20 % em balão volumétrico de 10 mL, completando o volume com água destilada.

A reação será realizada no escuro durante 120 minutos e lida em espectrofotômetro UV-VIS BEL PHOTONICS (Mod. UV-M51) em 765 nm. A análise será realizada em triplicata e os resultados expressos em miligramas de ácido gálico equivalente (GAE) por grama de amostra em base seca (mg GAE g⁻¹). Para a construção da curva analítica será utilizado ácido gálico a diferentes concentrações (0,45 – 4,50 mg L⁻¹).

5.6. Análise dos flavonóides totais (TFC)

A determinação do TFC foi realizada pelo método colorimétrico empregando cloreto de alumínio, conforme metodologia proposta por Chang *et al.* (2002) e adotada por Iora *et al.* (2015a).

O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonóides em metanol (Figura 7), ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Dessa

maneira, é possível determinar a quantidade de flavonóides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonóides nos tecidos vegetais. A leitura é feita em espectrofotômetro a 425 nm, utilizando-se cloreto de alumínio em metanol (Woisky, 1996; Woisky e Salatino, 1998). Nessas condições, o complexo flavonóide-Al absorve em comprimento de onda bem maior do que o flavonóide sem a presença do agente complexante. Os ácidos fenólicos, mesmo os que formam complexos com AlCl_3 , absorvem em comprimentos de onda muito inferiores, evitando-se dessa maneira interferências nas medidas de absorbância.

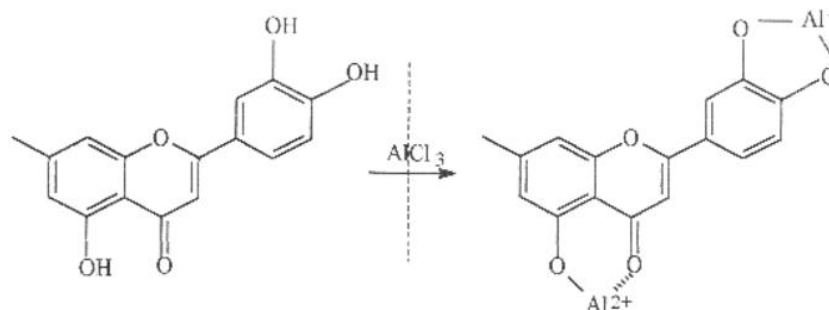


Figura 7. Formação do complexo Flavonóide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio (Reproduzido de Markham, 1982).

O método consiste na reação de 3 mL de água destilada, 50 μL de extrato hidroetanólico e adição de 150 μL de NaNO_2 5 %. Após 6 minutos, 300 μL de AlCl_3 10 % foi acrescentado e depois de 5 minutos, adicionado 1 mL de NaOH 1 mol L^{-1} . Após cada adição de reagente, a solução foi agitada com auxílio de Vortex e a absorbância lida em 506 nm após 15 minutos de reação em espectrofotômetro UV-VIS BEL PHOTONICS (Mod. UV-M51).

A análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos em miligramas de catequina equivalente (EC) por grama de amostra em base seca (mgEC g^{-1}). Para a construção da curva analítica foi utilizado padrão de catequina em diferentes concentrações (5 – 40 mg L^{-1}).

5.7. Análise das antocianinas totais (TMA)

O conteúdo de TMA foi determinado pelo método da diferença de pH proposta por Giusti *et al.* (1998), em que se dilui o extrato hidroetanólico em dois sistemas-tampão: cloreto de potássio pH 1,0 (0,025 mol L⁻¹) e acetato de sódio pH 4,5 (0,4 mol L⁻¹).

O método é baseado na capacidade da antocianina sofrer transformações estruturais reversíveis com alteração no pH, que se manifesta no espectro de absorção (Figura 8). Este ensaio permite a medição precisa e rápida das antocianinas totais, mesmo na presença de pigmentos e outros compostos interferentes.

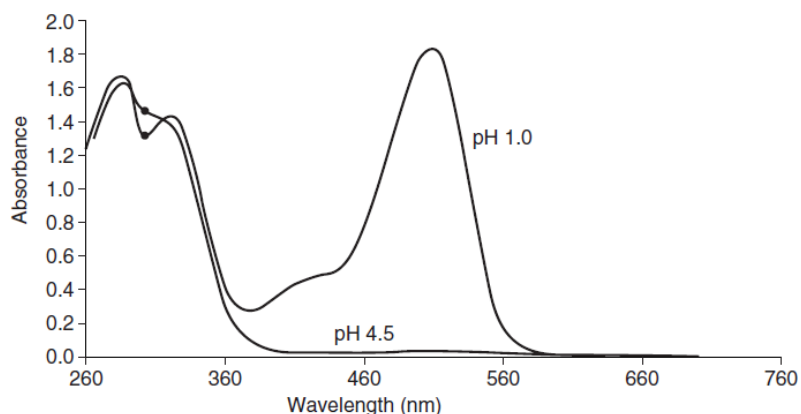


Figura 8. Características espectrais de antocianinas em solução tampão de pH 1,0 e pH 4,5.

Fonte: Autor.

A forma oxonium colorido predomina a pH 1,0 e a forma hemiacetal incolor a pH 4,5 (Figura 9).

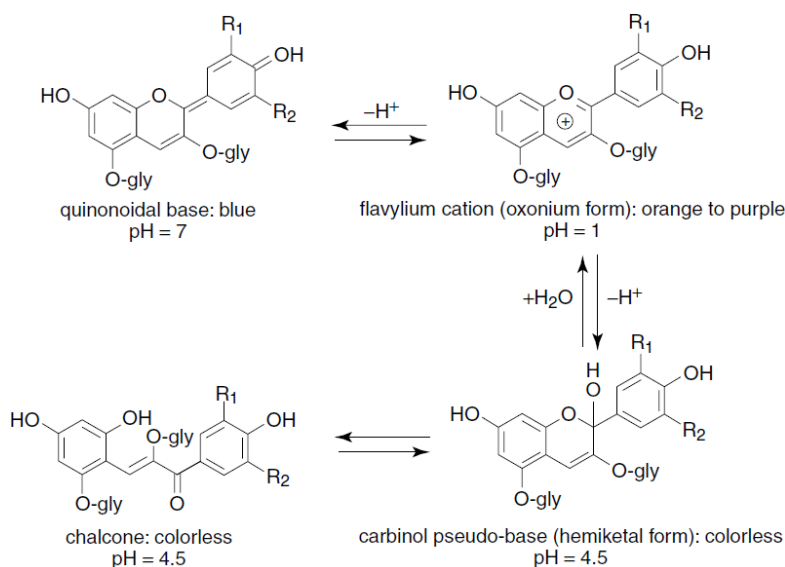


Figura 9. Formas estruturais predominantes de antocianinas presentes a diferentes níveis de pH.

Fonte: Autor.

O procedimento foi realizado com a adição de alíquota de 0,1 mL do extrato hidroetanólico em 1,9 mL da correspondente solução tampão (pH 1,0 ou pH 4,5) e medido no espectrofotômetro UV-VIS BEL PHOTONICS (Mod. UV-M51). Foi utilizado a Equação 1 para a quantificação, sendo o resultado será expresso em mg L^{-1} :

$$\text{TMA} = \frac{A \times \text{MM} \times \text{FD} \times 1000}{\lambda \times \varepsilon} \quad (1)$$

A concentração de pigmentos no extrato foi calculada e representada em cianidina-3-glicosídeo, onde na Equação 1, MM é a massa molecular ($449,2 \text{ g mol}^{-1}$), FD é o fator de diluição, λ é o caminho óptico da cubeta (1,0 cm) e ε é a absorvidade molar ($26900 \text{ L}^{-1} \text{ mol}^{-1}$). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

5.8. Determinação da atividade antioxidante in vitro

A atividade antioxidante foi determinada pelo método de captura de radical orgânico livre ABTS e DPPH, e pelo método de redução do íon ferro (FRAP).

5.8.1. ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis(ácido-3-etilbenzotiazoline-6-sulfônico)

A determinação da atividade de inibição do radical ABTS^{•+} (Figura 10) foi realizada conforme metodologia proposta por Socorro Moura Rufino, M. *et al.* (2007a).

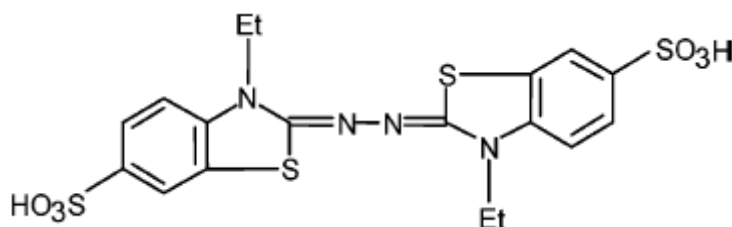


Figura 10. Reação de sequestro de radical.

Fonte: Prior, Wu e Schaich (2005)

Um volume de 25 mL de persulfato de potássio (2,6 mmol L⁻¹) foi adicionado a 25 mL de ABTS^{•+} (7,4 mmol L⁻¹). A solução foi armazenada em frasco âmbar, no escuro e temperatura ambiente, durante 16 h, para permitir a conclusão na geração do radical ABTS^{•+}. Etanol foi utilizado para ajustar a absorbância da solução em $0,700 \pm 0,050$ no comprimento de onda de 734 nm, em espectrofotômetro UV-VIS BEL PHOTONICS (Mod. UV-M51).

A quantificação foi realizada com a adição de 5 µL do extrato hidroetanólico em 3,0 mL de solução ABTS^{•+}. A mistura foi agitada em Vortex durante 5 segundos e armazenada no escuro a temperatura ambiente durante 30 minutos.

O etanol foi utilizado como branco e a análise realizada em triplicata. Os resultados foram expressos em micromol de Trolox equivalente (TE) por grama de amostra em base seca (µmol ET g⁻¹). Para a construção da curva analítica foi utilizado Trolox em diferentes concentrações (3 – 30 µmol TE L⁻¹). O Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) é um

antioxidante e análogo a vitamina E. Trolox é utilizado como referência pela comunidade científica, devido às dificuldades em medir componentes antioxidantes individuais de uma mistura complexa. Trolox e ABTS^{•+} foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

5.8.2. DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

A capacidade antioxidante foi determinada conforme metodologia via radical livre DPPH[•] proposta por Socorro Moura Rufino, M. *et al.* (2007b).

O teste de redução do radical DPPH[•] foi primeiramente sugerido em meados de 1950. Tempo depois o método foi utilizado para determinar a atividade antioxidante de fenóis em alimentos e amostras biológicas. O radical DPPH[•] é estável, de coloração púrpura, porém quando reduzido, passa a ter coloração amarela. A reação está expressa na Figura 11.

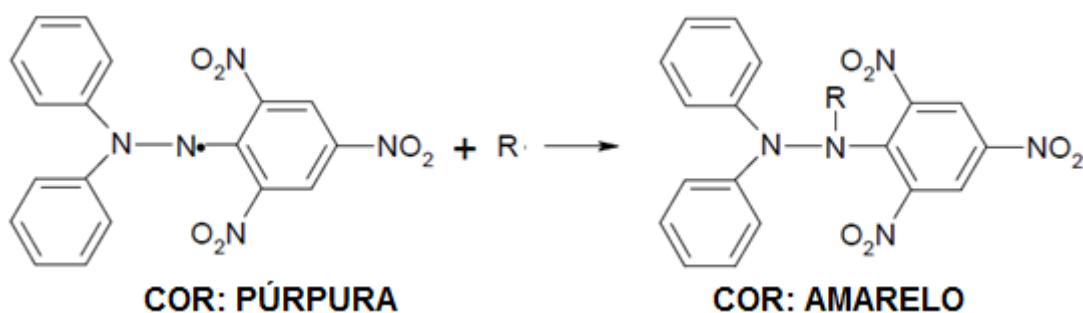


Figura 11. Reação de sequestro de radical.

Fonte: Prior, Wu e Schaich (2005)

O método é baseado na capacidade do DPPH[•] em reagir com doadores de hidrogênio. Na presença de substâncias antioxidantes, o DPPH[•] recebe H⁺, sendo então reduzido. Pode ser facilmente detectado por espectroscopia devido a sua intensa absorção na região do visível. O ensaio é iniciado pela adição do DPPH[•] à amostra, em solução. A capacidade da amostra de reduzir o DPPH, ou seja, evitar sua oxidação, é evidenciado pela porcentagem de DPPH restante no sistema. Então a porcentagem de DPPH

restante é proporcional à concentração de antioxidante (SANCHEZ-MORENO, 2002; BONDET et al. 1997).

A reação foi realizada com a adição de 5 μL do extrato hidroetanólico em 3,0 mL de solução metanólica de DPPH* 0,1 mmol L^{-1} . A mistura foi agitada em Vortex durante 5 segundos e armazenada no escuro a temperatura ambiente durante 30 minutos. Em seguida, a absorbância foi medida em espectrofotômetro UV-VIS BEL PHOTONICS (Mod. UV-M51) a 518 nm.

O metanol adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) foi utilizado para realizar a solução e como branco. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em micromol de Trolox equivalente (TE) por grama de amostra em base seca ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$). O Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e é um antioxidante análogo a vitamina E, utilizado devido às dificuldades em medir componentes antioxidantes individuais de uma mistura complexa e adotado pela comunidade como referência. Para a construção da curva de calibração, foi utilizado Trolox em diferentes concentrações (10 – 300 $\mu\text{mol TE L}^{-1}$).

5.8.3. Método de redução do Ferro (FRAP)

Este ensaio não é baseado na capacidade de captura de radicais livres, mas sim na habilidade de redução do íon Fe^{3+} . Em meio ácido o complexo férrico tripiridiltriazina é reduzido a sua forma ferrosa de intensa cor azul na presença de antioxidantes, conforme metodologia proposta por Socorro Moura Rufino *et al.* (2006). A Figura 12 representa a reação da redução do íon ferro durante o teste FRAP.

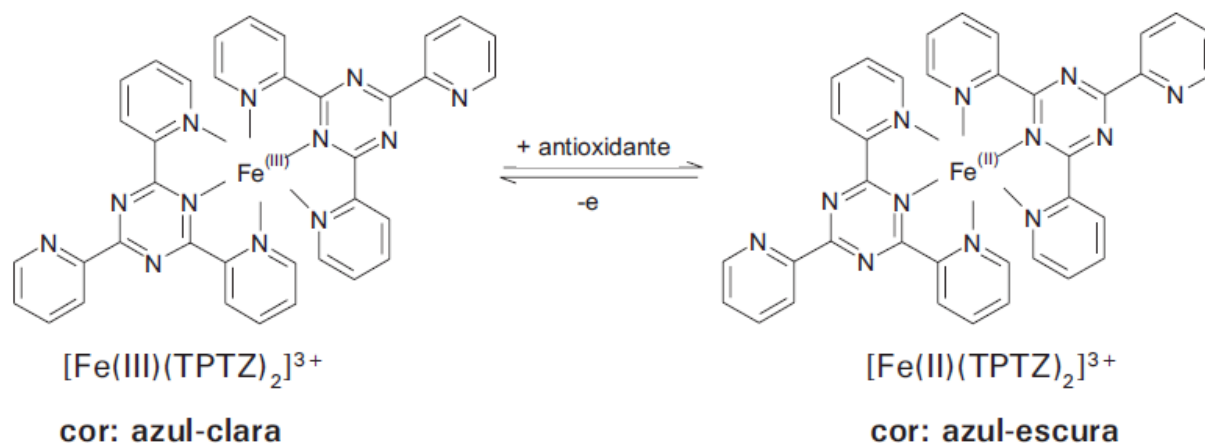


Figura 12. Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+} .

Fonte: Socorro Moura Rufino *et al.* (2006)

O reagente FRAP foi obtido a partir da combinação de 25 mL de solução tampão de acetato $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,6; 2,5 mL de uma solução de TPTZ 10 mmol L^{-1} e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mmol L^{-1} , devendo ser usado imediatamente após sua preparação.

A quantificação foi realizada com a adição de 100 μL do extrato hidroetanólico em 3,0 mL de reagente FRAP. A solução foi agitada durante 5 segundos e medido em 595 nm em espectrofotômetro UV-VIS BEL PHOTONICS (Mod. UV-M51) após 30 minutos de reação.

O etanol foi utilizado como branco e a análise realizada em triplicata. Os resultados expressos em micromol de Fe^{2+} equivalente por grama de amostra em base seca ($\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$). Para a construção da curva analítica foi utilizado $FeSO_4$ em diferentes concentrações (50 – 1500 $\mu\text{mol FeSO}_4$).

5.9. Análise dos compostos fenólicos por CLAE-DAD

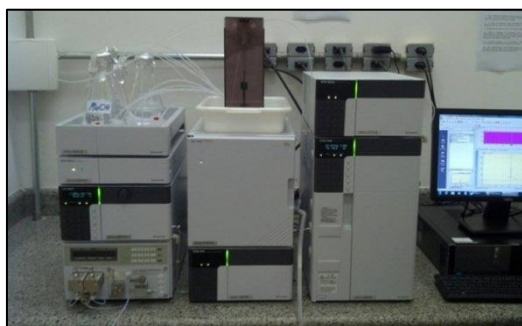
A análise dos compostos fenólicos majoritários foi realizado conforme descrito por Haminiuk *et al.* (2014), com injeção de 10 μL de extratos hidroetanólicos previamente filtrados em filtro de seringa 0,45 μm .

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), modelo Shimadzu Prominencia acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) e auto sampler (Figura 13C). Os dados coletados foram obtidos pelo software LCSolution fornecido pela Shimadzu (Figura 13A).

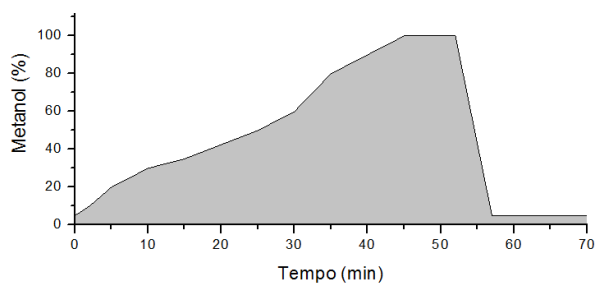
A separação foi realizada em gradiente conforme Tabela 3 e Figura 13B. A fase móvel foi composta de Ácido Acético 1,0% v/v (solvente A) e metanol (solvente B) adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Utilizou-se uma coluna Acclaim[®] 120 C18, 4,6 mm x 250 mm, 5 µm (Dionex, Salt Lake City, UT, USA) a 40 °C (Haminiuk *et al.*, 2014).

Tabela 3.
Programação do gradiente.

| Tempo (min) | Solvente A (%) | Solvente B (%) |
|-------------|----------------|----------------|
| 0 | 95 | 5 |
| 2 | 90 | 10 |
| 5 | 80 | 20 |
| 10 | 70 | 30 |
| 15 | 65 | 35 |
| 25 | 50 | 50 |
| 30 | 40 | 60 |
| 35 | 20 | 80 |
| 45 | 0 | 100 |
| 52 | 0 | 100 |
| 57 | 95 | 5 |
| 70 | 95 | 5 |



(A)



(B)



(C)

Figura 13. (A) Cromatógrafo Shimadzu Prominence; (B) Gradiente composto de metanol e água acidificada 1% ácido acético; (C) Detalhe da alocação de vãos da curva de calibração.

A vazão adotada foi $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e os ensaios monitorizados a 280, 320 e 370 nm. A quantificação foi realizada por meio de curvas de calibração externa com padrões Sigma e realizada em triplicata.

Os tempos de retenção foram avaliados com injeção de padrão externo separadamente nas mesmas condições de extração. Foram avaliados os parâmetros de recuperação, limite de detecção e limite de quantificação conforme Ribani *et al.* (2004).

Foram utilizados padrões HPLC adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Os analitos monitorados em 280 nm foram ácido gálico, teobromina, ácido siríngico, ácido vanílico, ácido trans-cinâmico e catequina. Em 320 nm foram monitorados ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido caféico, ácido p-coumárico e resveratrol. Em 370 nm foram monitorados quercetina e rutina.

5.10. Análises estatística

Os dados foram tratados com software STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Os valores foram relatados como média \pm desvio padrão (SD) para cada ensaio. Todos os resultados obtidos para as variáveis estudadas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e seguido por comparações feitas pelo teste de Tukey, com um nível de significância de 5%. A análise de correlação de Pearson foi realizada entre o TPC, TFC, TMA e a atividade antioxidante através do software Action® Versão 2.9 (Statcamp, São Carlos, SP).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação de grupos funcionais nos bagaços de uva

Primeiramente foram realizados os espectros de FTIR dos bagaços de uva para obter os grupos funcionais majoritários presentes. Os espectros de FTIR apresentados na Figura 14 exibem um elevado número de bandas, indicando a natureza complexa das amostras.

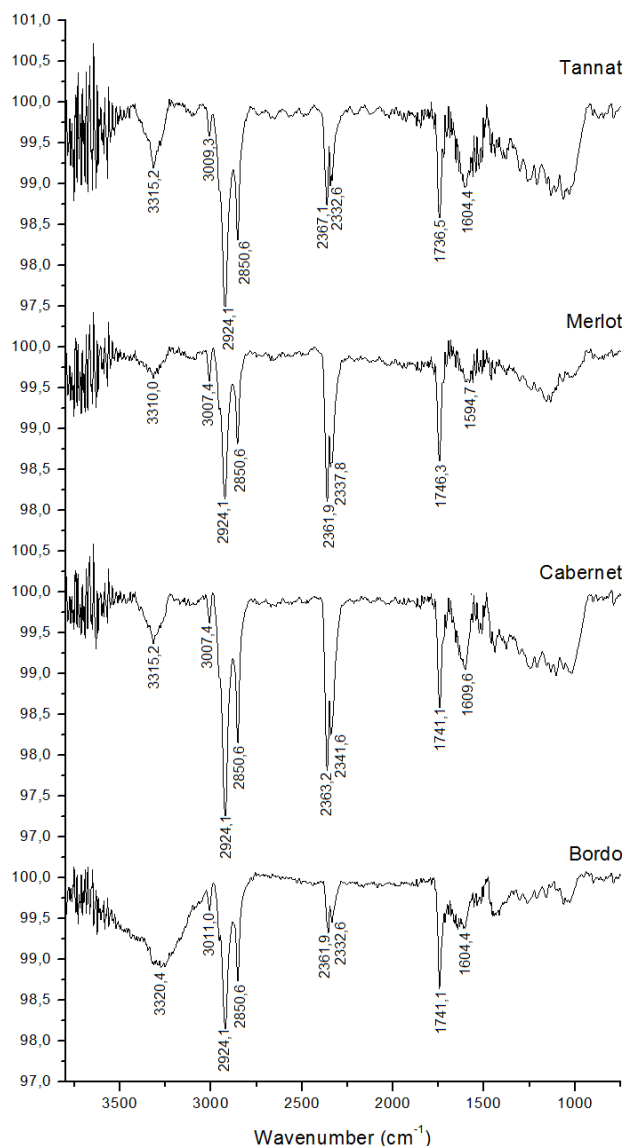


Figura 14. Espectros de infravermelho dos bagaços de uva.

Fonte: Autor.

Os resultados de espectro apresentam sobreposição de bandas. No entanto, alguns picos característicos foram identificados.

Devido à natureza complexa, bandas largas que aparecem na região de 3650 – 3200 cm^{-1} estão relacionados ao estiramento O-H, mas nesta região podem-se sobrepor os estiramentos N-H (3500 - 3300 cm^{-1}), $\equiv\text{C-H}$ sp (3300 cm^{-1}), $=\text{C-H}$ sp² (3095 – 3010 cm^{-1}). O estiramento nesta região pode estar relacionado diretamente à presença de umidade na amostra (Pavia et al., 2010).

As bandas localizadas na região de 2924,1 e 2850,6 cm^{-1} estão correlacionados a estiramentos $-\text{C-H}$ sp³ relacionado a $-\text{CH}_3$ (alcanos). O estiramento em 3010,0 cm^{-1} provavelmente esteja relacionado a estiramento $=\text{C-H}$ sp² (alcenos). Em 1740,0 cm^{-1} está associado ao estiramento C=O em ésteres alifáticos. Esta região também pode estar relacionada à conjugação do grupo C=O com C=C α , β ou com grupamento fenila. Esta região também pode ser devido à presença de CO_2 presente no ar atmosférico (Pavia et al., 2010.).

A interpretação de bandas localizadas na região abaixo de 1700 cm^{-1} torna-se equivocada, pois esta região é denominada a impressão digital da amostra. Em fim, não foram encontrados dados publicados relacionados aos bagaços de uva utilizados neste estudo para fins de comparação.

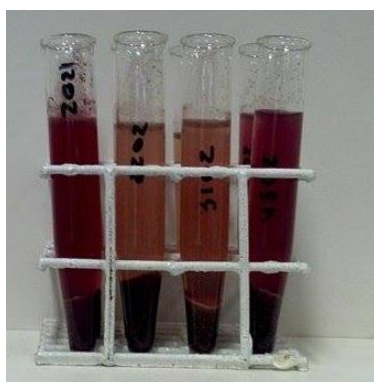
3.2. Efeito da proporção de solvente sobre o conteúdo fenólico total

Foi realizado o processo de extração sólido-líquido com solução hidroetanólica em diferentes proporções (20%, 40%, 60% e 80%) para se obter um extrato rico em composto fenólicos (Figura 15a e 15b).

Através das soluções obtidas, foi utilizado o ensaio de *Folin-Ciocalteu* para quantificação de fenóis totais (Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos, 1999) mediante curva de calibração (Figura 15c). Os resultados estão apresentados na Tabela 4.



(A)



(B)



(C)

Figura 15. (A) Extração hidroetanólica; (B) Extrato centrifugado. (C) Curva ácido gálico.

Fonte: Autor.

Tabela 4.

Concentração de compostos fenólicos totais por solução extratora.

| Amostras | Etanol / Água | | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | 20% | 40% | 60% | 80% |
| Bordo | 1680,46±39,15 ^c | 2316,20±97,20 ^c | 3415,57±335,71 ^b | 3182,20±139,15 ^c |
| Cabernet Sauvignon | 3255,94±24,98 ^a | 4901,66±87,62 ^a | 5671,84±152,29 ^a | 4854,78±17,78 ^a |
| Merlot | 2463,37±136,47 ^b | 4446,84±79,48 ^{ab} | 5051,25±108,96 ^a | 4638,86±109,16 ^a |
| Tannat | 2384,30±118,39 ^b | 4051,16±244,27 ^b | 5070,21±546,39 ^a | 4107,02±139,49 ^b |

[†] Resultados expressos em média de mg de ácido gálico equivalente (GAE) por 100 gramas de amostra seca ± S.D. (n = 3);

* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P < 0,05);

Fonte: Autor.

Através dos dados apresentados na Tabela 3, pode concluir que a solução extratora hidroetanólica 60% apresentou melhores resultados. Solução etanólica foi adotada devido ao baixo custo, alta disponibilidade e baixa toxicidade frente a outras soluções extratoras. Condições de extração

semelhantes foram encontradas na literatura (Amendola, De Faveri e Spigno, 2010; Antonioli et al., 2015; Medouni-Adrar et al., 2015). Considerando-se o solvente de extração utilizado em relação ao seu custo, recuperação e eficiência, diferentes misturas têm sido propostas, utilizando metanol e acetona (Amendola, De Faveri e Spigno, 2010; Fontana, Antonioli e Bottini, 2013).

3.3. Determinação de flavonóides e antocianinas monoméricas

Através da solução obtida, diferentes ensaios foram realizados com a solução hidroetanólica 60%, a fim de avaliar: o teor de flavonóides totais (TFC) e antocianinas totais monoméricas (TMA) (Tabela 5); avaliar a atividade antioxidante pelos métodos de captura de radical orgânico (ABTS, DPPH) e redução de íon metálico (FRAP) (Tabela 6); quantificação de compostos fenólicos majoritários por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (Tabela 8) e FTIR-ATR (Figura 16).

Tabela 5.
TPC, TFC e TMA determinado nos extratos hidroetanólicos.

| Amostras | TPC (mg GAE 100g ⁻¹) | TFC (mg EC g ⁻¹) | TMA (mg CG 100g ⁻¹) |
|--------------------|-------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| Bordo | 3415,57±335,71 ^b | 15,16±0,48 ^d | 157,66±9,57 ^a |
| Cabernet Sauvignon | 5671,84±152,29 ^a | 35,67±0,96 ^a | 39,86±2,80 ^c |
| Merlot | 5051,25±108,96 ^a | 28,44±0,82 ^b | 22,90±3,31 ^d |
| Tannat | 5070,21±546,39 ^a | 24,10±0,27 ^c | 86,52±6,82 ^b |

* Resultados expressos em média ± S.D. (n = 3);

** Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P <0,05);

TPC: compostos fenólicos totais; TFC: flavonóides totais; TMA: antocianinas totais monoméricas; GAE: equivalente ácido gálico; CE: catequina equivalente; CG: cyanidin-3-glucoside equivalente.

Os valores médios de TPC variaram entre as variedades BO, MT, TN e CS respectivamente 3415,57, 5051,25, 5070,21 e 5671,84 mg GAE 100g⁻¹. Não houve diferença significativa (P <0,05) entre o TPC nos extratos das variedades CS, MT e TN analisadas, mas uma diferença significativa no extrato da variedade BO (Tabela 5). A variedade CS foi à que exibiu maior teor de TPC e TFC, no entanto, pode-se verificar que o teor de TMA nas amostras apresentou uma relação inversa ao teor de TPC e TFC.

O TPC encontrado num estudo realizado por Rockenbach, Rodrigues, *et al.* (2011), apresentaram valores de 74,75 e 46,23 mg GAE g⁻¹ em peso fresco respectivamente para as variedades CS e MT. Bozan, Tosun e Ozcan (2008) encontraram 103,7 e 105,7 mg g⁻¹ em peso fresco de TPC respectivamente em sementes de uva de CS e MT. Estes valores estão próximos ao encontrado neste estudo. Dados referentes às variedades BO e MT não foram encontrados.

Trabalhos realizados por Doshi, Adsule e Banerjee (2006) e por Lago-Vanzela *et al.* (2011) demonstram que o conteúdo e perfil do TPC em uvas dependem do tipo de processo de vinificação, bem como as características genéticas, ambientais e culturais.

O CS também foi à variedade que apresentou teor mais elevado de TFC (35,67 mg EC g⁻¹). Valor próximo ao encontrado no estudo realizado por Rockenbach, Gonzaga, *et al.* (2011), onde foi encontrado 252 mg EC g⁻¹ na pele e 5312 mg EC g⁻¹ na semente, ambos referente em peso fresco. Bozan, Tosun e Ozcan (2008) encontrou TFC em sementes para as variedades CS e MT, respectivamente, 125,0 e 122,7 mg EC g⁻¹ em peso fresco. A variedade BO apresentou a menor concentração. Pode-se verificar pela Tabela 5 que o TPC e TFC podem estar correlacionados.

A Tabela 5 apresenta também a TMA nos extratos avaliados. Foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as variedades. Em contraste com o TPC, o bagaço da variedade BO apresentou maior teor de antocianinas (157,66 mg CG 100g⁻¹). Avaliando a TMA nas variedades analisadas como fonte de corantes naturais, o bagaço BO tem um potencial mais elevado que as outras variedades avaliadas neste estudo.

3.4. Determinação da capacidade antioxidante *In Vitro*

A atividade antioxidante foi avaliada devido estudos demonstrarem o consumo de antioxidantes naturais encontrados em frutas e vegetais apresentarem associação com baixo risco de doenças degenerativas (Renaud *et al.*, 1998).

O interesse na medição e avaliação da capacidade antioxidante está na importância da captura de espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais.

Os ROS podem ser ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}), radical lipídico (L^{\cdot}), dentre outros (Krinsky, 1994; Prior, Wu e Schaich, 2005; Fontana, Antonioli e Bottini, 2013).

Atualmente existe um grande número de métodos que são aplicadas para avaliar a atividade antioxidante de natureza lipofílica e hidrofílica, não havendo um consenso (Prior, Wu e Schaich, 2005; Fontana, Antonioli e Bottini, 2013).

A análise da capacidade antioxidante dos extratos de bagaço de uva foi mensurada através de três métodos diferentes (DPPH, ABTS e FRAP), apresentados na Tabela 6.

Tabela 6.
Capacidade antioxidante determinada por DPPH, ABTS e FRAP nos extratos hidroetanólicos.

| Samples | DPPH [*] ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$) | ABTS [*] ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$) | FRAP ($\text{mg FeSO}_4 \text{ L}^{-1}$) |
|--------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Bordo | 71,41 \pm 1,41 ^a | 45,07 \pm 1,06 ^{ab} | 2885,21 \pm 138,91 ^c |
| Cabernet Sauvignon | 73,89 \pm 1,41 ^a | 52,77 \pm 1,23 ^a | 4594,34 \pm 164,00 ^a |
| Merlot | 77,60 \pm 2,17 ^a | 51,56 \pm 5,70 ^a | 4111,22 \pm 71,85 ^b |
| Tannat | 76,11 \pm 4,29 ^a | 39,42 \pm 1,91 ^b | 3853,56 \pm 59,89 ^b |

* Resultados expressos em média \pm S.D.; n = 3.

** Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$); DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical assay; ABTS^{*}: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical assay; FRAP^{*}: ferric reduction assay; TE: Equivalente Trolox.

Os resultados apresentaram divergência em função dos métodos utilizados para mensurar a capacidade antioxidante, porém foram observadas diferenças significativas nos ensaios ($P < 0,05$).

O ensaio DPPH variou 71,41 – 77,60 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ nos extratos hidroetanólicos. O extrato de MT apresentou o valor mais elevado (77,60 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$), juntamente com a variedade TN (76,11 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$) e com diferença significativa menor que 0,05. A variedade CS apresentou 73,89 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$. Valor próximo ao encontrado no trabalho de Rockenbach, Gonzaga, *et al.* (2011) para CS (8281 $\mu\text{mol TE } 100\text{g}^{-1}$) na semente em peso fresco.

No ensaio ABTS, os extratos apresentaram comportamentos diferentes. Neste ensaio, o extrato CS apresentou maior atividade antioxidante

(52,77 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$) seguido pelo extrato da variedade MT (51,56 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$). O extrato TN a menor atividade (39,42 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$).

No ensaio FRAP, o extrato CS apresentou o maior resultado de 4594,34 mg $\text{FeSO}_4 \text{ L}^{-1}$, seguido pelo MT com 4111,22 mg $\text{FeSO}_4 \text{ L}^{-1}$. A variedade CS apresentou valor próximo ao encontrado no trabalho de Rockenbach, Gonzaga, *et al.* (2011) na semente de 10591 $\mu\text{mol Fe}^{2+} 100\text{g}^{-1}$.

A análise de correlação de Pearson (Tabela 7) foi realizada para explorar a relação entre os níveis de TPC, TFC, TMA e atividade antioxidante dos extratos.

Tabela 7.
Matriz de Correlação de Pearson e respectivos p-valores.

| ENSAIOS | TPC | TFC | TMA | DPPH | ABTS | FRAP |
|---------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| TPC | 1 | [†] 0,9947 | [†] -0,8824 | [†] 0,4072 | [†] -0,1773 | [†] 0,9835 |
| TFC | [‡] 0,0059 | 1 | [†] -0,8350 | [†] 0,3125 | [†] -0,0788 | [†] 0,9629 |
| TMA | [‡] 0,1175 | [‡] 0,1649 | 1 | [†] -0,7016 | [†] 0,4927 | [†] -0,9081 |
| DPPH | [‡] 0,5927 | [‡] 0,6874 | [‡] 0,2983 | 1 | [†] -0,9657 | [†] 0,5505 |
| ABTS | [‡] 0,8228 | [‡] 0,9211 | [‡] 0,5073 | [‡] 0,0343 | 1 | [†] -0,3430 |
| FRAP | [‡] 0,0164 | [‡] 0,0370 | [‡] 0,0918 | [‡] 0,4494 | [‡] 0,6570 | 1 |

[†] Matriz de Correlação de Pearson; [‡] Matriz de p-valores.

Através da correlação de Pearson, podemos verificar que o TPC tem correlação (0,9947) significativa com o TFC, comprovada pelo p-valor de 0,0059. Também se pode constatar a mesma relação com o teste antioxidante FRAP, com correlação 0,9835 e p-valor de 0,0164. Ambos apresentaram p-valor inferior ao nível de significância adotado de 5%, indicando correlação significativa entre o TPC, TFC e o teste antioxidante FRAP. Trabalho realizado por Xu *et al.* (2010) em óleo de sementes de uva também apresentaram correlação direta de TPC com TFC. A TMA apresentou boa correlação negativa (-0,8824) com a TPC.

O ensaio antioxidante ABTS apresentou correlação negativa (-0,1773) com o TPC, indicando que há baixa associação entre eles. O ensaio DPPH mostrou correlação superior ao ABTS (0,4072), mas não demonstrou uma boa correlação com o TPC.

Trabalho realizado por Thaipong *et al.* (2006), verificaram que o FRAP foi à técnica mais reprodutível e que apresentou uma elevada correlação com os teores de ácido ascórbico e grupos fenólicos obtidos de frutos de goiaba, pelos métodos ABTS, DPPH, FRAP e ORAC.

Trabalho realizado por Riceevans, Miller e Paganga (1997) relaciona a estrutura do composto fenólico com a atividade antioxidante de fenóis e é demonstrado na Tabela 8. Na Tabela 8, foi padronizada a atividade antioxidante da Vitamina C e E igual a um. Fica evidente que diferentes compostos apresentam atividade diferente. Estas peculiaridades no meio biológico podem apresentar efeitos sinérgicos ou antagônicos quando em conjunto.

Tabela 8.
Compostos antioxidantes e sua correlação na atividade antioxidante.

| Antioxidantes | Fontes | Atividade (mmol TEAC)* |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------|
| <i>Vitaminas</i> | | |
| Vitamina C | Frutas e vegetais. | 1,0±0,02 |
| Vitamina E | Grãos, nozes e óleos. | 1,0±0,03 |
| <i>Flavon-3-ols</i> | | |
| Quercetina | Cebola, pele de maçã, bagas, uvas pretas, chá e brócolis. | 4,7±0,10 |
| Kaempferol | Alho-poró, brócolis, uva e chá. | 1,3±0,08 |
| <i>Flavonas</i> | | |
| Rutina | Cebola, pele de maçã; bagas, uvas pretas, chá e brócolis. | 2,4±0,12 |
| <i>Flavon-3-ols</i> | | |
| Epicatequina | Vinho tinto. | 2,4±0,02 |
| <i>Ácidos hidrocínâmicos</i> | | |
| Ácido caféico | Uvas brancas, repolho e aspargo. | 1,3±0,01 |
| Ácido clorogênico | Maçã, pêra, cereja, tomate e pêssego. | 1,3±0,02 |
| Ácido ferúlico | Grãos, tomate, repolho e aspargo. | 1,9±0,02 |
| Ácido p-coumárico | Uvas brancas, tomate, repolho e aspargo. | 2,2±0,06 |

* Medido como o TEAC (atividade antioxidante Trolox equivalente).

A presença em excesso, ou até mesmo a ausência de algumas substâncias em amostras biológicas, podem representar resultados de atividade antioxidante sub ou sobre estimados. Na literatura, estudos sobre sinergismo e antagonismo de substâncias não foram encontrados.

3.5. Determinação de compostos fenólicos individuais por HPLC

Todos os extratos foram submetidos à análise por HPLC-DAD para quantificar compostos fenólicos (Figura 16). Derivados de flavonóides, estilbenos e ácidos (hidroxibenzóico e hidroxicinâmico) foram detectados e quantificados (Tabela 8).

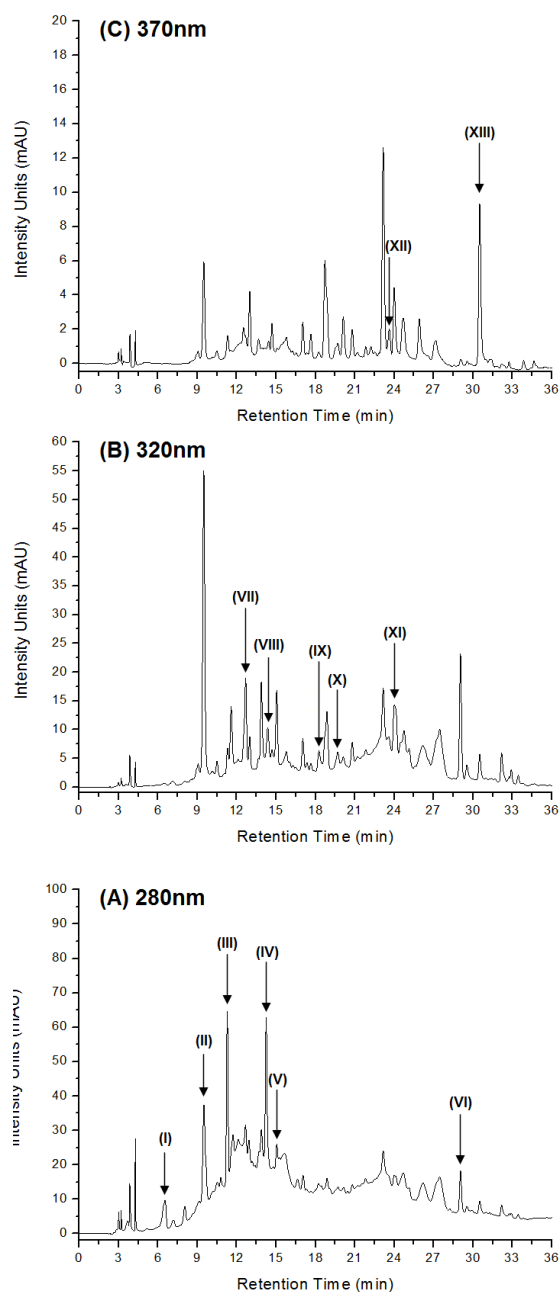


Figura 16. Cromatogramas da variedade Bordo (*Vitis vinifera* L.): (A) 280 nm; (B) 320 nm e (C) 370 nm. Note: (I) Ácido Gálico; (II) Teobromina; (III) Catequina; (IV) Ácido Vanílico; (V) Ácido Siríngico; (VI) Ácido trans-Cinâmico; (VII) Ácido Clorogênico; (VIII) Ácido Caféico; (IX) Ácido p-Coumárico; (X) Ácido Ferúlico; (XI) Resveratrol; (XII) Rutina; (XIII) Quercetina.

Tabela 8.
Quantificação de compostos fenólicos em extrato hidroetanólico (60%) de bagaço de uva por cromatografia líquida de alta eficiência.

| Compostos | λ (nm) | Equação | R ² | LD | LQ | T _R (min) | ^l Bordo | ^l Cabernet Sauvignon | ^l Merlot | ^l Tannat |
|------------------------|-------------------|----------------------------|----------------|------|------|-------------------------|--------------------------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>Ácidos</i> | | | | | | | | | | |
| <i>Hidroxibenzóico</i> | | | | | | | | | | |
| Ácido Gálico | 280 | y = -6434,11+29621,50*x | 0,98 | 0,04 | 0,39 | 6,55 | 10,44±0,29 ^c | 11,68±0,41 ^b | 14,32±0,02 ^a | 10,42±0,03 ^c |
| Ácido Siringóico | 280 | y = 4580,18+33614,27*x | 0,99 | 0,02 | 0,20 | 15,25 | 12,07±0,10 ^c | 136,50±6,40 ^a | 140,10±2,36 ^a | 37,22±0,99 ^b |
| Ácido Vanílico | 280 | y = -33675,07+71976,22*x | 0,99 | 0,01 | 0,08 | 14,30 | 26,33±0,61 ^d | 88,52±2,06 ^a | 63,67±1,31 ^b | 50,39±0,62 ^c |
| <i>Ácidos</i> | | | | | | | | | | |
| <i>Hidroxicinâmico</i> | | | | | | | | | | |
| Ácido Caféico | 320 | y = -89330,15 + 74270,21*x | 0,98 | 0,01 | 0,08 | 14,36 | 1,34±0,00 ^a | 0,66±0,01 ^b | 0,57±0,01 ^c | 0,36±0,00 ^d |
| Ácido p-Coumárico | 320 | y = -71576,47 + 75886,92*x | 0,98 | 0,03 | 0,34 | 18,3 | 1,11±0,01 ^b | 0,08±0,00 ^d | 0,26±0,01 ^c | 2,34±0,01 ^a |
| Ácido Ferúlico | 320 | y = -49585,43 + 72905,83*x | 0,98 | 0,02 | 0,21 | 19,6 | 1,03±0,19 ^a | 0,39±0,01 ^b | 0,32±0,02 ^b | 0,79±0,02 ^a |
| Ácido Clorogênico | 320 | y = 1777,72+22054,58*x | 0,99 | 0,08 | 0,79 | 12,71 | 12,98±0,08 ^a | 1,23±0,05 ^c | 1,24±0,02 ^c | 2,75±0,03 ^b |
| Ácido trans-Cinâmico | 280 | y = 55530,35+83436,83*x | 0,99 | 0,02 | 0,17 | 29,95 | 2,33±0,06 ^a | 1,49±0,32 ^b | 0,07±0,01 ^b | 0,96±0,04 ^b |
| <i>Flavonóides</i> | | | | | | | | | | |
| Quercetina | 370 | y = -58287,42+44466,75*x | 0,99 | 0,03 | 0,35 | 30,53 | 4,36±0,06 ^a | 2,78±0,01 ^c | 1,93±0,01 ^d | 3,94±0,02 ^b |
| Catequina | 280 | y = -12669,78+7729,21*x | 0,98 | 0,03 | 0,27 | 11,30 | 176,59±3,12 ^d | 479,79±7,78 ^a | 233,44±0,96 ^b | 222,19±1,67 ^c |
| Rutina | 370 | y = 6924,63+13533,05*x | 0,99 | 0,06 | 0,57 | 23,55 | 0,30±0,04 ^d | 6,05±0,04 ^b | 5,39±0,06 ^c | 10,61±0,05 ^a |
| <i>Estilbeno</i> | | | | | | | | | | |
| Resveratrol | 320 | y = -57,84+86900,82*x | 0,99 | 0,01 | 0,05 | 24,18 | 2,40±0,10 ^b | 1,26±0,02 ^c | 0,97±0,02 ^d | 3,60±0,03 ^a |

^l mg 100g⁻¹; n.d. = não detectado; LD: Limite de Detecção; LQ: Limite de Quantificação; T_R: Tempo de Retenção;

** Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P <0,05);

O LD e o LQ estão expressos em mg L^{-1} . Todos os analitos apresentaram valores acima do LQ.

O ácido gálico, um ácido fenólico não-flavonóide dentre os mais analisados em amostras de bagaço de uva, estava presente nas variedades BO, CS, MT e TN respectivamente em concentrações de 10,44, 11,68, 14,32 e 10,42 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$. Valores de 4,59 e 9,08 $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ em peso fresco respectivamente foram encontrados para as variedades CS e MT (Rockenbach, Rodrigues, et al., 2011). O ácido sirínico e vanílico foram um dos compostos mais presentes nos extratos, sendo o CS a variedade com concentração de 136,50 e 88,52 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ respectivamente, juntamente com a variedade MT, apresentando 140,10 e 63,67 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ respectivamente.

Em relação à rutina, foi encontrado para a variedade CS 6,05 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$, 5,39 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ para MT e para TN 10,61 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$. Rockenbach, Rodrigues, *et al.* (2011) encontrou 25,47 e 41,43 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ em peso fresco respectivamente para as variedades CS e MT.

O valor mais elevado encontrado em ambas as variedades foi a catequina. Um antioxidante natural pertencente ao grupo flavanóis. Os valores encontrados para as variedades BO, CS, MT e TN foram 176,59, 479,79, 233,44 e 222,19 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ respectivamente. Trabalho realizado por Rockenbach, Rodrigues, *et al.* (2011) encontraram valores de 150,16 e 122,29 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ em peso fresco respectivamente para as variedades CS e MT.

O elevado teor de catequina encontrado nas variedades pode estar relacionado com as sementes de uva, como sugerido no trabalho realizado por Montealegre *et al.* (2006), onde as sementes de uva são compostas quase exclusivamente de flavanóis como a catequina.

Foi possível detectar a presença de resveratrol no bagaço das quatro variedades em estudo. A TN apresentou 3,60 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$, o valor mais elevado entre as amostras, seguido pela variedade BO apresentando 2,40 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$. CS apresentou 1,26 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ e 0,97 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ para MT. Rockenbach, Rodrigues, *et al.* (2011) encontrou 4,02 e 6,40 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ em peso fresco respectivamente para as variedades CS e MT.

6.1. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Visto que os compostos bioativos apresentam estrutura simples e complexa, é necessária a avaliação de solventes utilizados no processo de extração para compostos específicos e de interesse para recuperação. Os compostos bioativos diferenciam-se um dos outros pelo seu maior caráter lipofílico ou hidrofílico, assim o solvente utilizado pode interferir no produto da extração nas mesmas condições de extração.

Outro ponto a destacar seria realizar um estudo dirigido com os compostos isolados, para ter uma melhor compreensão se suas propriedades antioxidantes individuais. Depois poderia ser avaliando suas propriedades em conjunto com outros compostos, para elucidar seus efeitos sinérgicos ou antagônicos. Esta etapa merece atenção especial, pois na capacidade antioxidante do extrato, cada composto colabora de forma distinta na capacidade antioxidante, além de levar em consideração a sua concentração no extrato.

Realizar a extração do óleo essencial do bagaço de uva, quantificação dos ácidos graxos presentes e estudos microbiológicos como inibição do seu crescimento.

7. CONCLUSÃO

Os dados demonstraram que as condições ambientais e de processamento afetam diretamente a composição do bagaço de uva numa mesma variedade, assim como o método utilizado para extração de compostos bioativos e o solvente utilizado.

As variedades Cabernet Sauvignon e Merlot apresentaram teor de compostos fenólicos totais e flavonóides mais elevados. A variedade Bordo apresentou teor mais elevado de antocianinas. A catequina foi o composto mais abundante no bagaço de uva de todas as variedades estudadas. A atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir de bagaço de uva mostrou que das variedades estudadas, a variedade Cabernet Sauvignon tem o maior potencial como fonte de compostos a ser aplicado como antioxidantes naturais em alimentos, seguido pela variedade Merlot. A variedade Bordo apresentasse como uma fonte potencial de corante natural dentre as analisadas.

A catequina, um flavonóide, foi o composto de maior concentração encontrado nas variedades estudadas, apresentando maior concentração na variedade Cabernet Sauvignon e Merlot. Ácido siríngico e vanílico apresentaram maior concentração nas variedades Cabernet Sauvignon e Merlot. Resveratrol apresentou maior concentração nas variedades Tannat e Bordo. Fatores como pressão de prensagem, tempo de maceração, espécie ou fatores climáticos, podem alterar os dados aqui apresentados.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que o bagaço de uva é uma rica fonte de compostos fenólicos, antocianinas e podem ser utilizados tanto para obtenção de antioxidantes e corantes naturais. Existem diferenças significativas entre as variedades em relação ao teor de compostos fenólicos, flavonóides e antocianinas, assim como a atividade antioxidante. Através da correlação de Pearson, verificou-se que a concentração de antocianinas é inversamente proporcional em relação ao teor de compostos fenólicos totais.

8. REFERÊNCIAS

- AGCAM, E.; AKYILDIZ, A.; EVRENDILEK, G. A. Comparison of phenolic compounds of orange juice processed by pulsed electric fields (PEF) and conventional thermal pasteurisation. **Food Chemistry**, v. 143, p. 354-361, Jan 15 2014.
- AHMED, I. A. et al. Antioxidant activity and phenolic profile of various morphological parts of underutilised *Baccaurea angulata* fruit. **Food Chemistry**, v. 172, p. 778-787, Apr 1 2015.
- ALCALDE-EON, C. et al. Anthocyanin and flavonol profiles of *Vitis vinifera* L. cv Rufete grapes. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 53, p. 76-80, Apr 2014.
- ALI, K. et al. Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 3, p. 357-378, Sep 2010.
- AMENDOLA, D.; DE FAVERI, D. M.; SPIGNO, G. Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts. **Journal of Food Engineering**, v. 97, n. 3, p. 384-392, Apr 2010.
- ANTONIOLLI, A. et al. Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. **Food Chemistry**, v. 178, n. 0, p. 172-178, 2015.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) International. 1995. Tannin in Distilled Liquors. AOAC Official Method 952.03. In Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed., (P. Cunniff, ed.) ch. 26, p. 16. AOAC Int., Arlington, Va.
- BAE, I. K. et al. Simultaneous determination of 15 phenolic compounds and caffeine in teas and mate using RP-HPLC/UV detection: Method development and optimization of extraction process. **Food Chemistry**, v. 172, p. 469-475, Apr 1 2015.
- BANON, S. et al. Ascorbate, green tea and grape seed extracts increase the shelf life of low sulphite beef patties. **Meat Science**, v. 77, n. 4, p. 626-633, Dec 2007.
- BARROS, A. et al. Evaluation of grape (*Vitis vinifera* L.) stems from Portuguese varieties as a resource of (poly)phenolic compounds: A comparative study. **Food Research International**, v. 65, Part C, n. 0, p. 375-384, 2014.
- BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; AREAS, J. A. G. Effects of dietary bioactive compounds on obesity induced inflammation. **Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 646-656, Jul 2009.
- BOIDO, E. et al. Aroma Composition of *Vitis vinifera* Cv. Tannat: the Typical Red Wine from Uruguay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5408-5413, 2003.
- BOZAN, B.; TOSUN, G.; OZCAN, D. Study of polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antiradical activity. **Food Chemistry**, v. 109, n. 2, p. 426-430, Jul 15 2008.
- CAN, N. O.; ARLI, G.; ATKOSAR, Z. Rapid determination of free anthocyanins in foodstuffs using high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1082-1089, Feb 15 2012.

CARIDI, D. et al. Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 691-699, 2007 2007.

CHANG, C. C. et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, p. 178-182, Sep 2002.

CHEN, P. X. et al. Characterization of free, conjugated and bound phenolics and lipophilic antioxidants in regular- and non-darkening cranberry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 185, p. 298-308, 2015.

CHEN, S. et al. Predicting the anthocyanin content of wine grapes by NIR hyperspectral imaging. **Food Chemistry**, v. 172, p. 788-793, Apr 1 2015.

CHEONG, M. W. et al. Volatile composition and antioxidant capacity of Arabica coffee. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 388-396, Apr 2013.

CHRISTENSEN, L. P.; FIDELIBUS, M. MERLOT. **University of California**, 2015. Disponível em: < http://iv.ucdavis.edu/viticultural_information/?uid=20&ds=351 >. Acesso em: 05/06/2015.

CHRISTENSEN, P. et al. CABERNET SAUVIGNON. **University of California**, 2015. Disponível em: < http://iv.ucdavis.edu/viticultural_information/?uid=8&ds=351 >. Acesso em: 05/06/2015.

CLARKE, O.; RAND, M. **Oz Clarke's Encyclopedia of Grapes**. Harcourt, 2001. ISBN 9780151007141. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=ReJJAAAYAAJ> >.

COLLINS, Carol H. Fundamentos de cromatografia. Campinas, SP: UNICAMP, c2006. 453 p. ISBN 8526807048.

DANI, C. et al. Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally-produced grapes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 12, p. 2574-2580, Dec 2007.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach**. 2nd. 2002. 515 ISBN 0470846275.

DOSHI, P.; ADSULE, P.; BANERJEE, K. Phenolic composition and antioxidant activity in grapevine parts and berries (*Vitis vinifera* L.) cv. Kishmish Chorny (Sharad Seedless) during maturation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 1-9, Aug 2006.

DROSOU, C. et al. A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. **Industrial Crops and Products**, v. 75, Part B, p. 141-149, 2015.

FONTANA, A. R.; ANTONIOLLI, A.; BOTTINI, R. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 38, p. 8987-9003, 2013.

FROMBAUM, M. et al. Antioxidant effects of resveratrol and other stilbene derivatives on oxidative stress and NO bioavailability: Potential benefits to cardiovascular diseases. **Biochimie**, v. 94, n. 2, p. 269-276, 2012.

GALINDO, I. et al. Comparative inhibitory activity of the stilbenes resveratrol and oxyresveratrol on African swine fever virus replication. **Antiviral Research**, v. 91, n. 1, p. 57-63, 2011.

GIACOSA, S. et al. Anthocyanin yield and skin softening during maceration, as affected by vineyard row orientation and grape ripeness of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. **Food Chemistry**, v. 174, p. 8-15, May 1 2015.

GIUSTI, M. M. et al. Anthocyanin pigment composition of red radish cultivars as potential food colorants. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 2, p. 219-224, Mar-Apr 1998.

GONZÁLEZ-CENTENO, M. R. et al. Proanthocyanidin composition and antioxidant potential of the stem winemaking byproducts from 10 different grape varieties (*Vitis vinifera* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 48, p. 11850-11858, 2012.

Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. São Paulo: CETESB, 2011. Disponível em: http://www.tratamentodeagua.com.br/r10/Lib/Image/art_704673733_Guia_Nacional_de_Coleta_e_Preservacao_de_Amostras_.pdf

HAMINIUK, C. et al. Extraction and quantification of phenolic acids and flavonols from *Eugenia pyriformis* using different solvents. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 10, p. 2862-2866, 2014.

IACOPINI, P. et al. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 8, p. 589-598, Dec 2008.

IORA, S. R. F. et al. Evaluation of the bioactive compounds and the antioxidant capacity of grape pomace. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 1, p. 62-69, 2015a.

_____. Evaluation of the bioactive compounds and the antioxidant capacity of grape pomace. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 62-69, Jan 2015b.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed.** 2014.

JAYAPRAKASHA, G. K. et al. Antioxidant and antimutagenic activities of *Cinnamomum zeylanicum* fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3-4, p. 330-336, May 2007.

KAMMERER, D. et al. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 14, p. 4360-4367, Jul 14 2004.

KRINSKY, N. I. THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF CAROTENOIDS. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, n. 5, p. 1003-1010, May 1994.

LAGO-VANZELA, E. S. et al. Phenolic Composition of the Edible Parts (Flesh and Skin) of Bordô Grape (*Vitis labrusca*) Using HPLC–DAD–ESI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 24, p. 13136-13146, 2011.

LANÇAS, Fernando Mauro. Cromatografia líquida moderna: HPLC / CLAE. Campinas, SP: Átomo, 2009. 382 p. ISBN 978857670123-1.

LIANG, N.-N. et al. Regional characteristics of anthocyanin and flavonol compounds from grapes of four *Vitis vinifera* varieties in five wine regions of China. **Food Research International**, v. 64, p. 264-274, Oct 2014.

LIMA, M. D. S. et al. Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced in industrial scale by different processes of maceration. **Food Chemistry**, v. 188, n. 0, p. 384-392, 2015.

_____. Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil. **Food Chemistry**, v. 161, p. 94-103, Oct 15 2014.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 12, p. 3479S-3485S, Dec 2004.

LU, M. et al. Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China. **Food Research International**, v. 44, n. 2, p. 530-536, Mar 2011.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, May 2004.

MEDOUNI-ADRAR, S. et al. Optimization of the recovery of phenolic compounds from Algerian grape by-products. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 123-132, 2015.

MONRAD, J. K. et al. Extraction of anthocyanins and flavan-3-ols from red grape pomace continuously by coupling hot water extraction with a modified expeller. **Food Research International**, v. 65, p. 77-87, Nov 2014.

MONTEALEGRE, R. R. et al. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6-7, p. 687-693, Sep-Nov 2006.

MUDNIC, I. et al. Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1205-1210, Apr 1 2010.

MULERO, J.; PARDO, F.; ZAFRILLA, P. Antioxidant activity and phenolic composition of organic and conventional grapes and wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 6, p. 569-574, Sep 2010.

OLEJAR, K. J.; FEDRIZZI, B.; KILMARTIN, P. A. Influence of harvesting technique and maceration process on aroma and phenolic attributes of Sauvignon blanc wine. **Food Chemistry**, v. 183, n. 0, p. 181-189, 2015.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, p. 10-36, Aug 2015.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. 4 ed. São Paulo, SP: Cengage Learning: 2010. 700 p.

POJER, E. et al. The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 5, p. 483-508, Sep 2013.

PRIOR, R. L.; WU, X. L.; 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, n. 10, p. 4290-4302, May 18 2005.

RENAUD, S. C. et al. Alcohol and mortality in middle-aged men from Eastern France. **Epidemiology**, v. 9, n. 2, p. 184-188, Mar 1998.

RIBANI, M. et al. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, Sep-Oct 2004.

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, n. 7, p. 933-956, 1996.

RICEEVANS, C. A.; MILLER, J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152-159, Apr 1997.

ROCKENBACH, I. I. et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 897-901, 2011.

_____. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 174-179, 2011.

_____. Solvent Influence on total polyphenol content, anthocyanins, and antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) bagasse extracts from Tannat and Ancelota - different varieties of *Vitis vinifera* varieties

Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 28, p. 238-244, 2008-12 2008.

SANTOS, E. O. L. et al. Flavonols modulate the effector functions of healthy individuals' immune complex-stimulated neutrophils: A therapeutic perspective for rheumatoid arthritis. **International Immunopharmacology**, v. 21, n. 1, p. 102-111, Jul 2014.

SANTOS-BUELGA, C.; MATEUS, N.; DE FREITAS, V. Anthocyanins. Plant Pigments and Beyond. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 29, p. 6879-6884, Jul 23 2014.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Oxidants and Antioxidants, Pt A**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SKINNER, M.; HUNTER, D. **Bioactives in Fruit : Health Benefits and Functional Foods**. Somerset, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2013.

SOCORRO MOURA RUFINO, M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). **EMBRAPA**, p. 4, 2006.

_____. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS. **EMBRAPA**, p. 4, 2007a.

_____. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **EMBRAPA**, p. 4, 2007b.

SOCORRO MOURA RUFINO, M. D. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS. p. 4, 2007.

SPIGNO, G.; TRARNELLI, L.; DE FAVERI, D. M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 200-208, Jul 2007.

SURVESWARAN, S. et al. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 938-953, 2007 2007.

TANNAT. **National Grapes Registry**, 2015. Disponível em: < <http://ngr.ucdavis.edu/varietyview.cfm?varietynum=3304> >. Acesso em: 05/06/2015.

THAIPONG, K. et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6-7, p. 669-675, Sep-Nov 2006.

TOMAS-BARBERAN, F. A.; ANDRES-LACUEVA, C. Polyphenols and Health: Current State and Progress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 8773-8775, Sep 12 2012.

TOURNOUR, H. H. et al. Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 397-406, 2015.

TRUONG, V. D. et al. Pressurized liquid extraction and quantification of anthocyanins in purple-fleshed sweet potato genotypes. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 26, n. 1-2, p. 96-103, May-Jun 2012.

TUBEROSO, C. I. G. et al. Antioxidant capacity and vasodilatory properties of Mediterranean food: The case of Cannonau wine, myrtle berries liqueur and strawberry-tree honey. **Food Chemistry**, v. 140, n. 4, p. 686-691, Oct 15 2013.

WANG, Y. et al. An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 431-435, Jan 30 2002.

WICZKOWSKI, W.; SZAWARA-NOWAK, D.; TOPOLSKA, J. Changes in the content and composition of anthocyanins in red cabbage and its antioxidant capacity during fermentation, storage and stewing. **Food Chemistry**, v. 167, p. 115-123, Jan 15 2015.

WROLSTAD, R. E. et al. Preface. In: (Ed.). **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

XIA, E. Q. et al. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 2, p. 622-646, Feb 2010.

XIE, L.; BOLLING, B. W. Characterisation of stilbenes in California almonds (*Prunus dulcis*) by UHPLC-MS. **Food Chemistry**, v. 148, p. 300-306, Apr 1 2014.

XU, C. et al. Extraction, distribution and characterisation of phenolic compounds and oil in grapeseeds. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 688-694, Oct 1 2010.

YU, J.; AHMEDNA, M. Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 221-237, Feb 2013.

ZHU, F. et al. Advance on the bioactivity and potential applications of dietary fibre from grape pomace. **Food Chemistry**, v. 186, n. 0, p. 207-212, 2015.