

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CÂMPUS PATO BRANCO
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA**

CRISTIANE DE MOURA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS
ETANÓLICOS DE RESÍDUOS PROVENIENTES DA
FABRICAÇÃO DE VINHO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**PATO BRANCO
2014**

CRISTIANE DE MOURA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS
ETANÓLICOS DE RESÍDUOS PROVENIENTES DA FABRICAÇÃO DE
VINHO**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado à Comissão de Diplomação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Pato Branco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Solange Teresinha Carpes.

Pato Branco – PR
2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE RESÍDUOS PROVENIENTES DA FABRICAÇÃO DE VINHO** foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora **Nº 2.5/2013-B** de 2014.

Fizeram parte da banca os professores.

Dr^a. Solange Teresinha Carpes

Dr^a. Marina Leite Mitterer Daltoé

Daiane Pereira

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus pelo dom da vida e pela saúde, possibilitando a concretização de mais esse sonho.

À minha família que me apoiou em todos os momentos difíceis desde o início da faculdade, principalmente ao meu pai Samuel e minha mãe Elizabete por todos os bons conselhos, paciência, apoio e confiança.

À minha orientadora Dr^a. Solange Teresinha Carpes, por todo apoio, paciência e ensinamentos dedicados durante todos esses anos de aprendizado.

Aos amigos, entre eles Luiz Fernando, Patrícia e Barbara, pela amizade, paciência e convivência durante toda a graduação.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram na realização deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridade, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridade e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por se omitir! Não tenhas medo dos tropeços da jornada. Não podemos esquecer que nós, ainda que incompleto, fomos o maior aventureiro da história.”

Augusto Cury

RESUMO

Moura, Cristiane de. Avaliação da atividade antioxidante de extratos etanólicos de resíduos de uva provenientes da fabricação de vinho. 2014. 57 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Química – Bacharelado em Química Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2014.

Atualmente a procura por produtos naturais que desempenham com eficiência a atividade antioxidante em alimentos está cada vez mais, atraindo a atenção de novos pesquisadores. Os principais compostos que podem atuar com essa ação, são os compostos fenólicos, esses podem ser encontrados em diversas plantas, frutas e em até mesmo, resíduos agroindustriais. Deste modo, o principal objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial antioxidante do resíduo obtido pela fabricação do vinho tinto (RVT) e vinho branco (RVB) com a intenção de futuramente ser utilizado como antioxidante natural na elaboração de novos produtos alimentícios. Neste estudo a atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos de sequestro dos radicais DPPH* e ABTS*, porcentagem de inibição pelo sistema beta-caroteno/ácido linoleico e poder redutor do Ferro (FRAP) e comparada com os antioxidantes sintéticos eritorbato de sódio, BHT (Butilhidroxitolueno) e BHA (Butilhidroxianisol) e com antioxidante natural o α -tocoferol usados como controle positivo. O RVT e RVB apresentaram teor de compostos fenólicos totais de 21,66 mg EAG/g de resíduo e 20,54 mg EAG/g de resíduo respectivamente (EAG: Equivalente em ácido gálico). Enquanto que o teor encontrado para os flavonoides foi de 0,84 mg QE/g de resíduo e 0,65 mg QE/g de resíduo, respectivamente (QE: Equivalente em quercetina). A atividade antioxidante avaliada pelo sequestro de radical DPPH e expresso em IC₅₀ (IC₅₀:Concentração inibitória ou equivalente mínima do antioxidante para sequestrar 50% dos radicais iniciais) foi de 0,66 e 1,14 mg/mL, para o RVT e RVB, respectivamente. Enquanto que pelo sequestro do ABTS expresso em umol de Trolox obteve-se 150,68 umol de Trolox/g para o RVT e 145,91 umol de Trolox/g para o RVB. Quando analisado pelo método de inibição do beta caroteno/ácido linoleico, os extratos avaliados na concentração de 5 mg/mL apresentaram inibição de 82,92% e 81,42%, para os RVT e RVB, respectivamente e não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). Pela análise da redução do Ferro (FRAP), o extrato do RVT foi possível reduzir 56,29 μ mol de Fe²⁺/g enquanto o RVB 38,52 μ mol de Fe²⁺/g de resíduo. O resíduo do processo de obtenção do vinho tinto mostrou superioridade em todas as análises realizadas quando comparadas ao resíduo do vinho branco. Entre os antioxidantes comerciais usados neste estudo, o eritorbato de sódio se destacou em todas as análises, sendo que a menor atividade antioxidante foi apresentada pelo BHT. Os resíduos do processo de obtenção do vinho tinto e vinho branco apresentaram atividade antioxidante inferior ao eritorbato de sódio, BHT, BHA e o α -tocoferol. Pelos resultados encontrados, podemos afirmar que os resíduos provenientes do vinho tinto e vinho branco, podem ser considerados uma opção aos antioxidantes sintéticos principalmente devido a restrição do uso desses antioxidantes sintéticos nos alimentos devido ao efeito deletério a saúde.

Palavras-chave: Fenólicos. Flavonoides; Antioxidante.

ABSTRACT

MOURA, Cristiane de. Evaluation of antioxidant activity of ethanol extracts of grape waste from the manufacture of wine. 2014. 57 f. Work of Course Conclusion - Course in Chemistry - Bachelor in Industrial, Chemistry, Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, 2014.

The search for natural products that perform efficiently the antioxidant activity in foods is having a lot of attention in research today. The main compounds that can act with this action, are phenolic compounds, these can be found in various plants, fruits and even vegetables residues. In this way, the main objective of this work was to evaluate the antioxidant potential of the residue obtained from the manufacture of red wine (RVT) and white wine (RVB) with the intention that in future be used as a natural antioxidant in the elaboration of new food products. In this study the antioxidant activity was evaluated by the method of sequestration of DPPH * and ABTS * radicals, percentage inhibition by beta-carotene/linoleic acid system and reducing power of iron (FRAP) and compared with synthetic antioxidants sodium erythorbate, BHT (butylhydroxytoluene) and BHA (Butilhidroxianisol) and the natural antioxidant α -tocopherol used as positive control. The RVT and RVB showed content of total phenolics of 21.66 mg GAE / g of residue and 20.54 mg GAE / g of residue, respectively (EAG: Equivalent gallic acid). While the content in flavonoids found was 0.84 mg QE / g of residue and 0.65 mg QE / g of residue, respectively (QE: Equivalent quercetin). The antioxidant activity was evaluated by DPPH radical sequestration and expressed as IC₅₀ (IC₅₀: inhibitory concentration or minimum equivalent antioxidant to sequester 50% of the initial radicals) was 0.66 and 1.14 mg / mL, for the RVT and RVB, respectively. While for the kidnapping expressed in ABTS umol Trolox was obtained Trolox 150.68 umol / g for the RVT and Trolox 145.91 umol / g for RVB. When analyzed by the method of inhibition of beta carotene / linoleic acid, the extracts evaluated at a concentration of 5 mg / ml were inhibited by 82.92% and 81.42% for RVT and RVB, respectively and did not differ significantly by the Tukey test ($p < 0.05$). For the analysis of the reduction of iron (FRAP), the extract was able to reduce the RVT 56.29 micromol Fe 2 + / g while the RVB 38.52 micromol Fe 2 + / g of residue. The residue of the process to obtain red wine showed superiority in all analyzes when compared to the residue of white wine. Among the commercial antioxidants used in this study, sodium erythorbate excelled in all analyzes, with the lowest antioxidant activity was presented by BHT. The residues of obtaining red wine and white wine process presented below the sodium erythorbate, BHT, BHA and α -tocopherol antioxidant activity. The results, we can state that waste from red wine and white wine may be considered an option to synthetic antioxidants mainly due to restriction of the use of these synthetic antioxidants in foods due to deleterious health effects.

Keywords: Antioxidant. Phenolics. Flavonoid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas da fabricação do Vinho tinto.....	16
Figura 2: Etapas da fabricação do Vinho branco.....	17
Figura 3: Rota do ácido chiquímico para biossíntese de fenólicos.....	21
Figura 4 - Estrutura básica de um flavonoide composto por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C).	22
Figura 5 - Principais rotas biossintéticas.	22
Figura 6: Ácidos fenólicos derivados do (a) ácido benzóico e (b) ácido cinâmico.....	23
Figura 7: Reação do radical DPPH com o antioxidante, nesse caso a Quercetina. ...	26
Figura 8 - Oxidação do ABTS por persulfato de potássio e a coloração inicial da solução ABTS ^{•+}	27
Figura 9 - Redução do complexo TPTZ com Fe ³⁺ á Fe ²⁺ pela adição de um antioxidante	28
Figura 10 - Estrutura do beta-caroteno (5) e do ácido linoleico (6)	29
Figura 11- Resíduo de Vinho Tinto seco e triturado	30
Figura 12 - Resíduo de Vinho Branco seco e triturado.....	31
Figura 13 - Extrato etanólico do RVT	36
Figura 14 - Extrato etanólico do RVB	36
Figura 15 - Curva Padrão de ácido gálico para determinação de compostos fenólicos	37
Figura 16 - Curva Padrão de quercetina para quantificação de flavonoides	38
Figura 17 - Curva Cinética para estabilização do sequestro do radical livre frente ao RVT nas concentrações 1; 0,67; 0,50; 0,40; 0,33; 0,28 mg/mL.....	41
Figura 18 - Curva Cinética para estabilização do sequestro do radical livre frente ao RVB nas concentrações 2; 1,25; 0,67; 0,50; 0,40 mg/mL.	42
Figura 19 - Gráfico para o cálculo do IC ₅₀ =X e Y=50 para o RVB.....	42
Figura 20 - Gráfico para o cálculo do IC ₅₀ =X e Y=50 para o RVT.....	43
Figura 21 - Curva Padrão de Fe ²⁺ para o FRAP	47
Figura 22 - Curva Padrão do Trolox frente ao radical ABTS	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de Uvas no Brasil, por Unidade de Federação (ton).	15
Tabela 2 - Classificação dos compostos fenólicos.	20
Tabela 3 - Quantificação de compostos fenólicos e flavonoides	38
Tabela 4 - Resultados da análise do sequestro do radical DPPH	43
Tabela 5 - Resultados beta-caroteno/ácido linoleico para os resíduos	45
Tabela 6 - Resultados β -caroteno/ácido linoleico para os antioxidantes sintéticos ...	46
Tabela 7 - Resultados FRAP das amostras RVT e RVB e antioxidantes comerciais	47
Tabela 8 - Resultados análise do sequestro do radical ABTS.....	49

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

ABTS	2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)
%AA	atividade antioxidante
α	alfa
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
β	Beta
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrihidrazil
DR _C	taxa de degradação da amostra controle
DR _S	taxa de degradação da amostra contendo a substância teste
EAG	equivalente em ácido gálico
FRAP	Poder antioxidante de redução do ferro
IC ₅₀	Coeficiente de inibição (concentração mínima da substância antioxidante necessária para reduzir em 50 % a concentração inicial de DPPH).
RVB	Resíduo de Vinho Branco
RVT	Resíduo de Vinho Tinto
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 VITICULTURA DO BRASIL.....	15
3.2 VINHO	16
3.3 CARACTERIZAÇÕES DOS SUBPRODUTOS.....	17
3.4 COMPOSTOS BIOATIVOS: ANTIOXIDANTES NATURAIS	18
3.4.1 Compostos fenólicos	19
3.4.1.1 Flavonoides	21
3.4.1.2 Ácidos fenólicos	23
3.5 ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS	24
3.6 MÉTODOS DE ANÁLISE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	24
3.6.1 Métodos de Análise de Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	25
3.6.1.1 Método da inibição do DPPH	26
3.6.1.2 Método do sequestro do radical ABTS ⁺	27
3.6.1.3 Método da redução do Ferro (FRAP)	28
3.6.1.4 Método de descoloramento do β -caroteno/ácido linoleico	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 COLETA E PREPARAÇÃO DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	30
4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS	31
4.3 ANÁLISES QUÍMICAS	31
4.3.1 Determinação de Compostos Fenólicos Totais	32
4.3.2 Determinação de Flavonoides totais	32
4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	32
4.4.1 Atividade de sequestro do radical DPPH•	33
4.4.2 Atividade antioxidante pela oxidação acoplada do beta-caroteno e ácido linoleico	33
4.4.3 Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro - FRAP (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>)	34
4.4.4 Atividade antioxidante frente ao ABTS ⁺	34

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS	35
5.2 COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES.....	36
5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	40
5.3.1 Atividade de sequestro do radical DPPH'	40
5.3.2 Atividade antioxidante pela oxidação acoplada do beta-caroteno e ácido linoleico	44
5.3.3 Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro - FRAP (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>)	46
5.3.4 Atividade antioxidante frente ao ABTS ⁺	48
6 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

A busca por antioxidantes naturais está cada vez mais se intensificando, devido a possível toxicidade dos antioxidantes sintéticos em determinadas doses. Diversas pesquisas estão sendo realizadas principalmente à habilidade antioxidante de substâncias naturais em sequestrar os radicais livres, que quando em desequilíbrio podem ser prejudiciais à saúde humana (MARIUTT; BRAGAGNOLO, 2007).

Os compostos fenólicos estão entre as substâncias mais estudadas na indústria alimentícia, devido suas propriedades redutoras e estrutura química, podendo trazer diversos impactos positivos utilizando estes para esta ação antioxidante (SIMÕES, 2001).

O resíduo de uva, composto por semente, casca, engaço e restos da polpa da uva, tem seu conteúdo rico em compostos fenólicos, antocianinas, corantes e outros compostos com atividades fitoterápicas e com excelente capacidade antioxidante. No Brasil, cerca de aproximadamente 580 milhões de toneladas de vinhos, sucos e mostos são preparados e destes uma quantidade significativa de resíduos são gerados, podendo trazer impactos negativos ao meio ambiente quando descartados de forma inadequada. Sendo assim, se bem aproveitados podem trazer vários ganhos tanto econômicos como ambientais (FERRARI, 2010).

Deste modo, esse trabalho tem como objetivo determinar a atividade antioxidante dos extratos etanólicos dos resíduos provenientes do processo de fabricação do vinho tinto e branco de pequenas vinícolas da cidade de Mariópolis, Paraná.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo determinar a atividade antioxidante dos extratos etanólicos dos resíduos provenientes do processo de fabricação do vinho tinto e branco de pequenas vinícolas da cidade de Mariópolis, Paraná.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar os extratos etanólicos;
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais e teor de flavonoides totais de todos os extratos etanólicos;
- Avaliar as propriedades antioxidantes através dos métodos: sequestro do radical livre DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazina) e ABTS[•], auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico e FRAP.
- Comparar os resultados dos resíduos com antioxidantes comerciais utilizado na indústria alimentícia.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 VITICULTURA DO BRASIL

As uvas finas (*Vitis vinífera*) foram as primeiras uvas introduzidas pelos portugueses no Brasil. No entanto, a viticultura, apenas se consolidou com a introdução da cultivar de uva americana “Isabel” (*Vitis labrusca*) pelos imigrantes italianos, nos meados do século XIX (CAMARGO; MAIA; RITSCHEK, 2010).

No Brasil, a produção de uvas se destacam nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste. Estados como Rio Grande do Sul, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Pernambuco, Bahia e Minas Gerais, são um dos principais produtores. Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, também são apontados como potenciais produtores de uvas de mesa (MELLO, 2010). Na Tabela 1 está distribuída a produção de uva no Brasil por Unidade de Federação.

Tabela 1 - Produção de Uvas no Brasil, por Unidade de Federação (ton).

UF	2008	2009	2010	2011	2012
Brasil	1.399.262	1.345.719	1.295.442	1.463.481	1.455.809
Pernambuco	162.977	158.515	168.225	208.660	224.758
Bahia	101.787	90.508	78,283	65.435	62.292
Minas Gerais	13.711	11.773	10.590	9.804	10.107
São Paulo	184.930	177.934	177.538	177.227	176.902
Paraná	101.500	102.080	101.900	105.000	70.500
Santa Catarina	58.330	67.546	66.214	67.767	70.909
Rio Grande do Sul	776.027	737.363	692.692	829.589	840.251

Fonte: UVIBRA, 2012.

Em específico o Rio Grande do Sul, é o principal produtor de uva como produtor de vinho, sucos e derivados. Em 2012 sua produção foi de 579,31 milhões de litros, representando 90% da produção nacional (MELLO, 2010).

3.2 VINHO

Dentre as diversas alternativas para o aproveitamento da uva produzida no Brasil, temos o vinho. De acordo com a legislação brasileira o vinho é exclusivamente uma bebida resultante da fermentação alcoólica completa ou parcial da uva fresca, esmagada ou não, ou do mosto simples ou virgem, com um conteúdo de álcool adquirido mínimo de 7% (v/v a 20 °C), sendo divididos em três tipos: vinho tinto, rosado e branco e também classificados em vinho de mesa, leve, fino, espumante, frisante, gaseificado, licoroso e composto (BRASIL, 1988).

As principais etapas para fabricação do vinho é a colheita, onde esta deve ser feita no tempo certo, sendo que uma colheita prematura resulta em um vinho aguado, com baixa concentração de álcool enquanto que uma colheita tardia produz um vinho rico em álcool, porém com pouca acidez. Após a colheita, as uvas são separadas do engaço e seguidas para o esmagamento, onde se obtém uma mistura de suco, casca e sementes e este dependendo do tipo de vinho, opta-se por processos diferentes como demonstrado nas figuras 1 e 2 (MENEZES, 2010).



Figura 1: Etapas da fabricação do Vinho tinto
Fonte: SASSO et al. (2014).

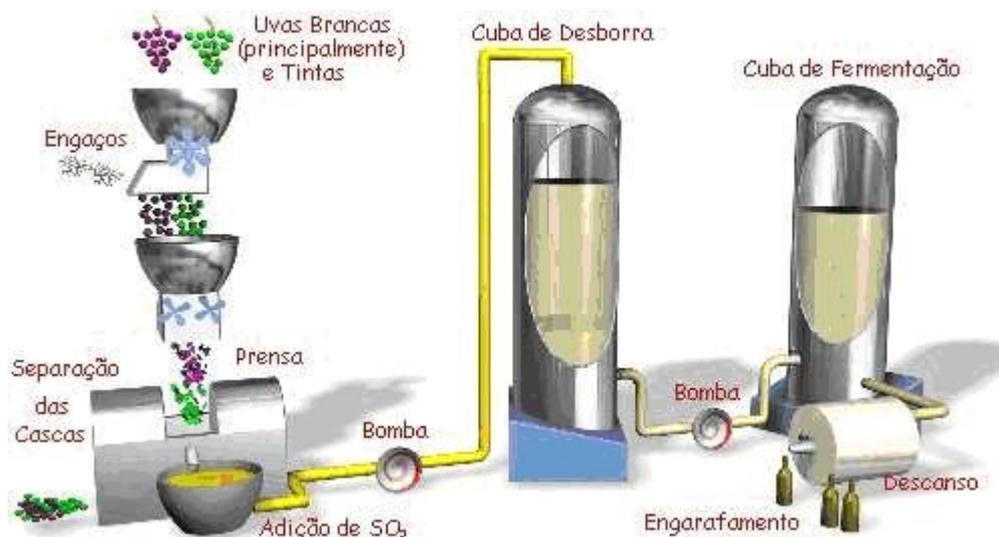


Figura 2: Etapas da fabricação do Vinho branco
Fonte: SASSO et al. (2014).

A fermentação é a etapa mais complexa e importante para elaboração de um bom vinho, normalmente a levedura mais utilizada para esse processo é a *Saccharomyces cerevisiae*, mas diversos micro-organismos desse gênero estão sendo utilizados. Por fim, são utilizados processos de filtração, centrifugação, refrigeração, troca iônica, aquecimento e também é feita a adição de dióxido de enxofre ou ácido ascórbico, que agem como antioxidantes. Nessas etapas, o vinho é clarificado, grande parte dos produtos precipitáveis são extraídos, e muitos íons metálicos que tornam o vinho turvo, são retirados. O envelhecimento do vinho é muito utilizado para melhorar o sabor e odor, diminuindo a acidez e formando esses complexos utilizados para o melhoramento (MENEZES, 2010).

3.3 CARACTERIZAÇÕES DOS SUBPRODUTOS

Estão presentes no resíduo resultante do processamento do vinho, o engaço e bagaço, neles contendo borras, sementes, além do material filtrado dos líquidos, dentre outros (FERRARI, 2010). Atualmente, esse resíduo é muito utilizado como ração animal e como adubo de vinhedos, mas grande parte é ainda desperdiçada,

podendo causar alguns danos ambientais, devido a grande quantidade gerada no processo (ROCKENBACH, 2011).

Esses resíduos podem ser de grande interesse econômico, sendo que muitos dos compostos presentes na uva não foram totalmente extraídos durante seu processamento. Os principais componentes são sementes, casca e engaço. As sementes contém fibra, óleo, proteínas, compostos fenólicos, açúcares e sais minerais. A casca é rica em pigmentos, como antocianidinas e antocianinas pertencentes ao grupo dos flavonoides. Já o engaço, contém compostos tânicos, que apresenta alto potencial nutritivo e farmacológico (FERRARI, 2010).

3.4 COMPOSTOS BIOATIVOS: ANTIOXIDANTES NATURAIS

Os resíduos provenientes do vinho contém inúmeros compostos que podem auxiliar na atividade antioxidante, provavelmente devido ao sequestro de radicais livres e conseqüente benefício ao organismo (MELO, 2010).

Os radicais livres, são moléculas altamente reativas e instáveis. Podem ser definidos como moléculas ou átomos que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. Essas moléculas encontram-se envolvidas em processos de produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, entre outros. Mas quando em excesso, alteram funções fisiológicas normais do organismo, como a peroxidação de lipídeos de membrana, a agressão às proteínas, enzimas, carboidratos e DNA (BARREIROS; DAVID, 2006).

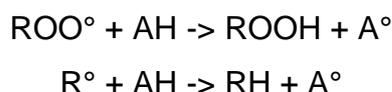
Além dos diversos problemas a saúde, os radicais livres podem interferir na qualidade sensorial e nutricional de diversos alimentos, por atuarem principalmente na oxidação de matérias facilmente oxidáveis, como óleos e gorduras (BARREIROS; DAVID, 2006).

Para a captura desses radicais livres, a indústria de alimentos tem empregado a adição de antioxidantes, assim o processo oxidativo é retardado. Esses antioxidantes podem ser sintéticos, como por exemplo, BHA, BHT, eritorbato ou naturais, provenientes de produtos naturais como o α -tocoferol e vitamina C. No

organismo, enzimas e antioxidantes produzidos pelo organismo ou originários de dietas, retardam a oxidação das células (MELO, 2010).

Os três principais mecanismos que podem atuar na redução da formação de radicais livres são antioxidantes, sequestrantes de radicais livres e quelantes, sendo classificados em primários e secundários (RAMALHO, 2006).

Os antioxidantes primários são capazes de interromper a propagação da auto-oxidação ao doarem átomos de hidrogênios, como simplificado abaixo.



Sendo ROO° e R° radicais livres, AH antioxidantes com hidrogênio ativo e A° radical inerte formado devido à ação do antioxidante, onde o radical livre é estabilizado (ROOH) devido a captura do hidrogênio ativo (RAMALHO, 2006).

Já nos antioxidantes secundários, estão inclusos os agentes quelantes/sequestrantes, sinergistas e removedores de oxigênio, cada um atuando com diversos mecanismos, como diminuindo a taxa de oxidação, repondo moléculas de hidrogênio para os primários, quelar metais pró-oxidantes e desativá-los, agir como sequestradores de oxigênio, entre outros (RAMALHO, 2006).

3.4.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos estão entre as substâncias mais estudadas na indústria alimentícia, devido suas propriedades redutoras e estrutura química. Possuem no mínimo um anel aromático e uma hidroxila como grupo funcional em sua estrutura, sendo a estrutura mais simples o fenol (SIMÕES, 2001).

Já foram encontradas cerca de 8000 estruturas diferentes para os compostos fenólicos. São classificados de acordo com sua cadeia carbônica, conforme a tabela 2.

A maioria dos compostos fenólicos são encontrados, na natureza na forma de ésteres ou de heterosídeos, portanto sendo solúveis em água e solventes orgânicos apolares.

Tabela 2 - Classificação dos compostos fenólicos.

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C_6
Ácidos fenólicos	C_6-C_1
Acetofenonas, ácidos fenilacéticos	$C_{26}-C_2$
Ácidos hidrocixinâmicos, fenilpropanóides	C_6-C_3
Naftoquinonas	C_6-C_4
Xantonas, benzofenonas	$C_6-C_1-C_6$
Estilbenos, antroquinonas	$C_6-C_2-C_6$
Flavonoides, isoflavonoides e chalconas	$C_6-C_3-C_6$
Lignanas, Neolignanas	$(C_6-C_3)_2$
Diflavonóides	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Melaninas vegetais	$(C_6)_n$
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$
Taninos hidrolisáveis	$(C_6-C_1)_n$
Taninos condensados	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Fonte: HARBORNE, 1989.

Os compostos fenólicos podem ser formados por meio de duas rotas biogenéticas: a via de ácido chiquímico a partir de carboidratos (Figura 3) e pela via do acetato-polimalato que se se inicia com a acetil-coenzima A e malonil-coenzima A (HARBORNE, 1989). Assim, os compostos provenientes da via chiquímico, têm seus grupos hidroxilas na posição *orto*, enquanto os compostos pela via do acetato-polimalato origina compostos com as hidroxilas na posição *meta* (DEWICK, 1998).

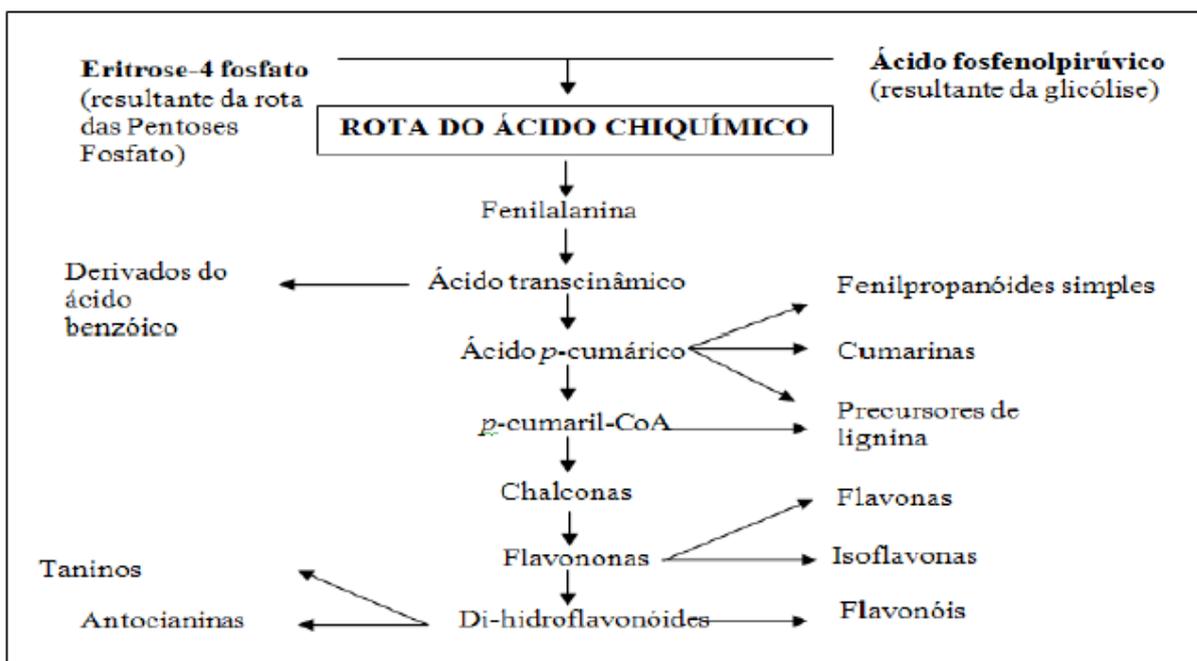


Figura 3: Rota do ácido chiquímico para biossíntese de fenólicos.
Fonte: NATIVIDADE, 2010.

Os compostos fenólicos presentes na uva, e conseqüentemente presentes no resíduo gerado pelas mesmas, são em ordem crescente de concentração: os flavonoides, os ácidos fenólicos e os taninos (JORDÃO et al., 1998).

3.4.1.1 Flavonoides

Os flavonoides são uma das classes mais relevantes no grupo de compostos fenólicos, sua síntese não ocorre na espécie humana, mas são constituintes de frutas, vegetais e bebidas derivadas de planta. Sua estrutura mais encontrada é o difenil-propano ($C_6-C_3-C_6$), e consiste em obrigatoriamente dois anéis aromáticos (anéis A e B) interligados por três átomos de carbonos, onde geralmente contem um oxigênio, como mostra a figura 4 (BRAVO, 1998).

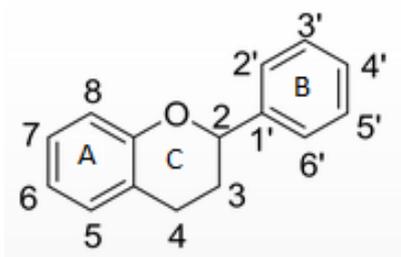


Figura 4 - Estrutura básica de um flavonoide composto por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C).
Fonte: BRAVO, 1998

A síntese dos flavonoides acontece através da combinação dos dois mecanismos para obtenção dos compostos fenólicos (via de ácido chiquímico e via do acetato-polimalato), como simplificado na figura 5.

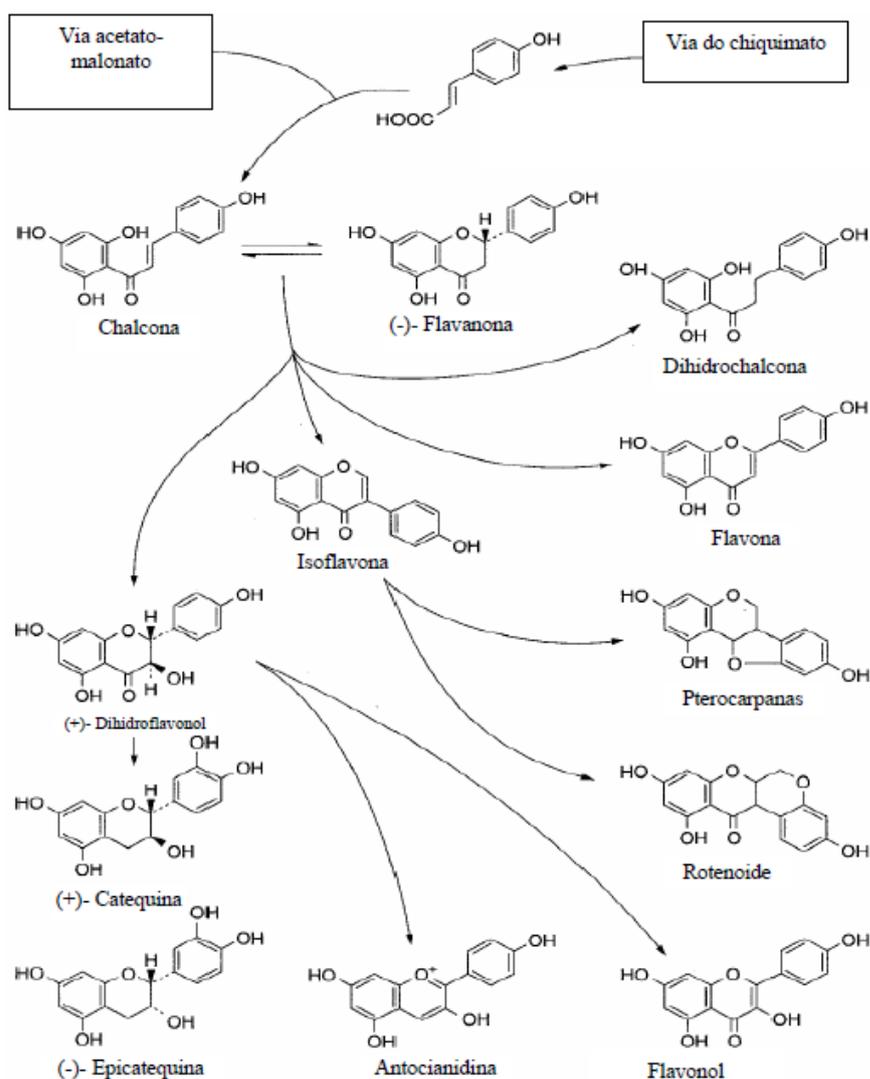


Figura 5 - Principais rotas biossintéticas.
Fonte: RICE-EVANS et al., 1997.

Entre os principais flavonoides encontrados no resíduo da uva, estão presentes as antocianinas e as catequinas, responsáveis principalmente pela cor e adstringência do suco de uva.

3.4.1.2 Ácidos fenólicos

Já os ácidos fenólicos, também conhecidos como não-flavonoides, tem como principais grupos os ácidos benzoicos, ácidos cinâmicos e cumarinas. Sua alta atividade antioxidante está relacionada principalmente pela posição dos grupos hidroxilas e também pela proximidade da carboxila em relação ao grupo fenil (SILVA et al., 2010). A estrutura básica dos ácidos fenólicos derivado do ácido benzoico e ácido cinâmico estão exemplificados na figura 6.

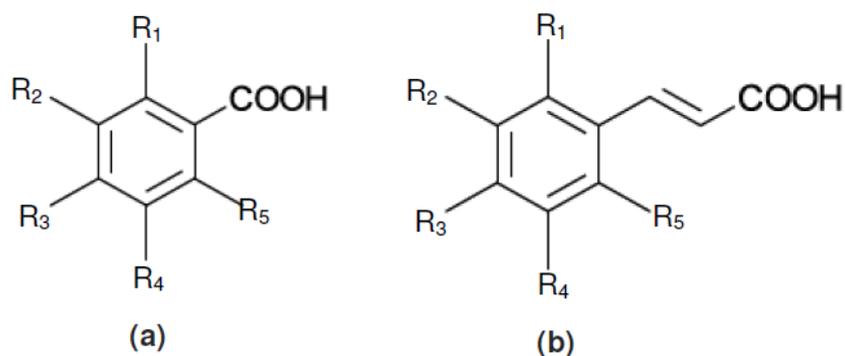


Figura 6: Ácidos fenólicos derivados do (a) ácido benzóico e (b) ácido cinâmico. Fonte - SILVA et al. (2010).

A diversidade de compostos presentes nesses grupos é devido a capacidade de substituição de diferentes compostos nos radicais (R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5), onde a mudança de apenas um radical altera sua funcionalidade (SILVA et al., 2010).

Outro grupo importante dos compostos fenólicos são os taninos, polifenóis com altíssima importância por seus efeitos antiinflamatórios, anticarcinogênicos e cicatrizante. São divididos em taninos hidrolisáveis e condensáveis e seu alto peso molecular confere aos alimentos uma sensação de adstringência (MONTEIRO et al., 2005).

O resveratrol, principal componente dos estilbenos, também é pertencente a família dos não flavonoides. É muito estudado devido sua alta atividade antioxidante (MONTEIRO et al., 2005).

3.5 ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS

Os antioxidantes são capazes de prevenir a deterioração oxidativa dos alimentos, sendo esses compostos majoritariamente aromáticos que contem pelo menos uma hidroxila, podendo ser sintéticos como BHA, BHT, eritorbato de sódio, entre vários outros.

O eritorbato de sódio, objeto de estudo neste trabalho, é largamente utilizado na indústria cárnea, agindo principalmente na redução do oxigênio molecular, evitando assim a formação de radicais livres, tornando-se, potentes redutores, enquanto os antioxidantes como BHA e BHT contém um anel fenólico em sua estrutura, onde as hidroxilas são capazes de doar um átomo de hidrogênio ao radical livre, podendo desativá-los (ARAÚJO, 2011 apud CASAROTTO, 2013).

Apesar da eficácia desses compostos na ação antioxidante, os mesmos vêm sendo questionados, uma vez que estes compostos podem fornecer efeitos tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (MERCADANTE et al., 2010)

Para seleção de antioxidantes para aplicação na indústria alimentícia é necessário que a eficácia dos mesmos seja em baixas concentrações, ausência de efeitos indesejáveis na cor, odor e sabor, fácil aplicação e estabilidade durante a produção e armazenamento (RAMALHO; JORGE, 2006).

3.6 MÉTODOS DE ANÁLISE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

Desde que os radicais livres foram identificados como moléculas que causam grandes efeitos maléficos, tanto nos alimentos como na saúde, a procura por

substâncias que possam diminuir ou até interromper suas ações vem aumento a cada dia, bem como métodos para avaliar o potencial antioxidante dessas substâncias (CARPES, 2008).

De modo geral, os efeitos antioxidantes podem ser mensurados por meio de sistemas químicos e biológicos, sendo que para uma resposta precisa e quantitativa é necessário realizar diferentes métodos. A maioria das análises realizadas utiliza processos oxidativos, os quais envolvem a adição de um agente iniciador para acelerar o processo, entre os principais agentes são: temperatura, agitação, disponibilidade de oxigênio, metal de transição ou mesmo exposição à luz (ANTOLOVICH et al., 2002).

Existem quatro passos essenciais que devem ser seguidos ao avaliar a atividade antioxidante de substâncias sendo elas: a primeira etapa é a quantificação e identificação de compostos fenólicos, a segunda etapa avalia a atividade de sequestro do radical livre e na terceira etapa deve ser feita a avaliação da habilidade do antioxidante inibir ou retardar a oxidação lipídica. Por fim a última e quarta etapa depende do objetivo do estudo, podendo ser dividida em (a) e (b). A etapa (a) sugere-se a aplicação em alimentos com análises específicas e (b) avaliação dos efeitos antioxidantes da dieta no corpo humano, onde estudos de intervenção são necessários (BECKER et al., 2004).

3.6.1 Métodos de Análise de Atividade Antioxidante *in vitro*

Os métodos mais utilizados para a determinação da ação antioxidante são os colorimétricos com as leituras realizadas em espectrofotômetros. Os principais métodos utilizados para essa razão são: sequestro do radical livre DPPH, descoloramento do sistema β -caroteno/ácido linoleico, captura do radical ABTS e o FRAP (BERGAMASCHI, 2010).

3.6.1.1 Método da inibição do DPPH

O DPPH é um radical de nitrogênio orgânico, estável de cor violeta e possui absorção máxima na faixa de 515-520 nm. A redução do radical é monitorada pelo decréscimo da absorbância durante a reação, devido a presença de um doador de hidrogênio ou elétron, a intensidade de absorção diminui, e conseqüentemente a solução com o radical perde cor, tornando-se amarela, de acordo com o número de elétrons capturados (CLEYTON, 2007).

Os resultados desse método podem ser apresentados de diversas maneiras, sendo o mais utilizado o IC₅₀, cujo valor representa a quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração de DPPH inicial pela metade (BERGAMASCHI, 2010).

Na figura 7, é possível compreender como ocorre a doação do próton da quercetina para o radical DPPH, resultando na perda de coloração da solução e conseqüentemente a redução do radical DPPH para uma molécula estável. A quercetina já oxidada se transforma em um radical inerte onde se estabiliza por ressonância (TEIXEIRA; SILVA, 2013)

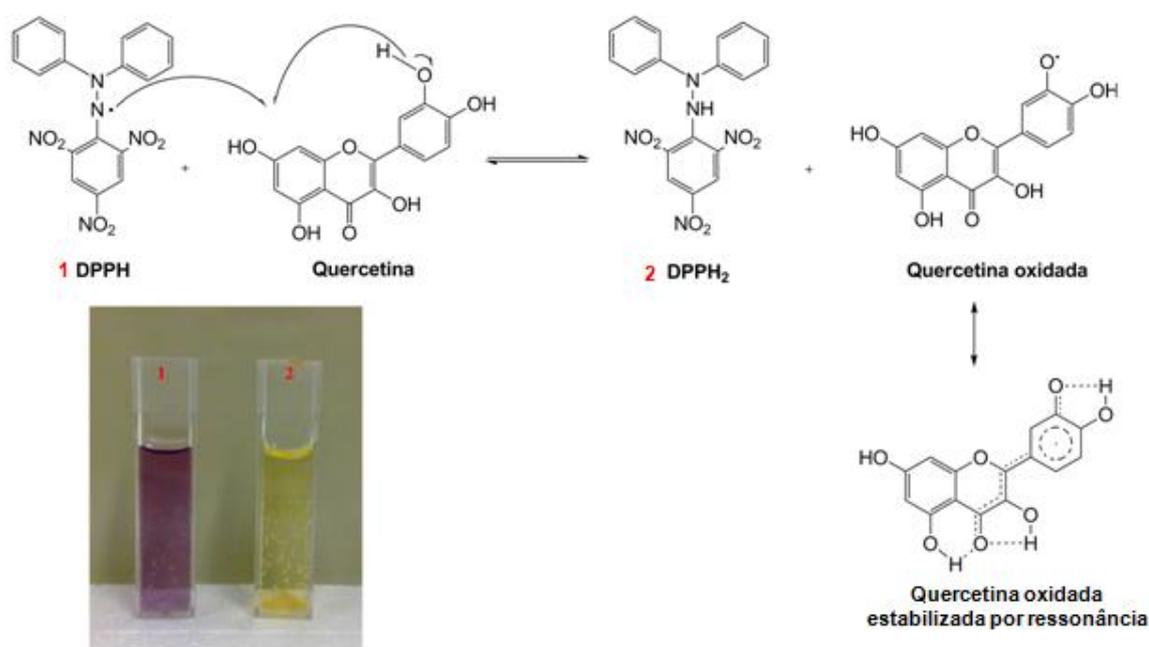


Figura 7: Reação do radical DPPH com o antioxidante, nesse caso a Quercetina.

Fonte - TEIXEIRA; SILVA (2013).

3.6.1.2 Método do sequestro do radical $ABTS^{\cdot+}$

O método ABTS determina a atividade antioxidante total pela captura do radical $ABTS^{\cdot+}$. O procedimento é baseado na formação de solução do radical $ABTS^{\cdot+}$ (Figura 8), a partir da oxidação do sal por persulfato de potássio, cuja reação ocorre na ausência de luz, durante 12 a 16 horas. Após a formação do radical $ABTS^{\cdot+}$, com a adição de um antioxidante ocorre a redução da solução anterior em apenas ABTS, e assim promove a perda da coloração do meio reacional. Essa absorbância da reação é comparada com a atividade do antioxidante sintético Trolox (padrão). O trolox é um antioxidante sintético análogo a vitamina E, porém solúvel em substâncias polares, ou seja, hidrofílico. Os resultados são expressos em μmol de Trolox/g de amostra (SINGLETON et al., 1999).

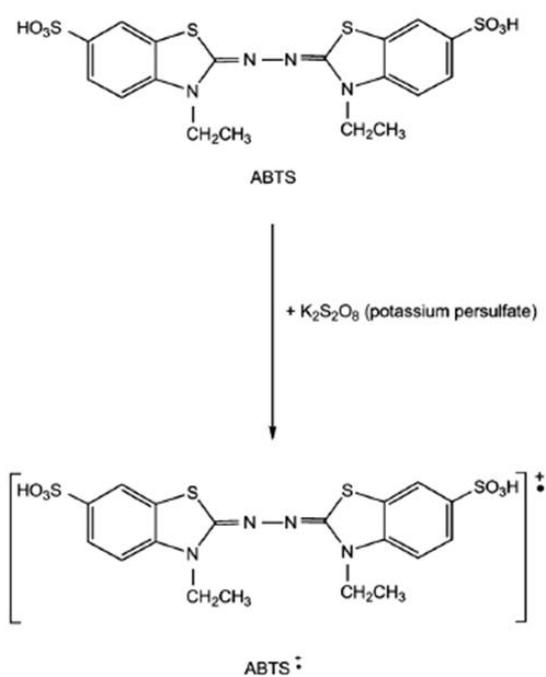


Figura 8 - Oxidação do ABTS por persulfato de potássio e a coloração inicial da solução $ABTS^{\cdot+}$

Fonte: LEE, Y., YOON, J. (2005).

3.6.1.3 Método da redução do Ferro (FRAP)

O método FRAP, é um ensaio baseado na capacidade de um antioxidante reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} . Essa reação ocorre na presença de 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) e em condições ácidas, onde ocorre a formação de um complexo corado. Assim este complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe^{III} -TPZ) é reduzido ao complexo ferroso (Fe^{II} -TPZ) na presença de um antioxidante (PULIDO, 2000) como mostra a figura 9.

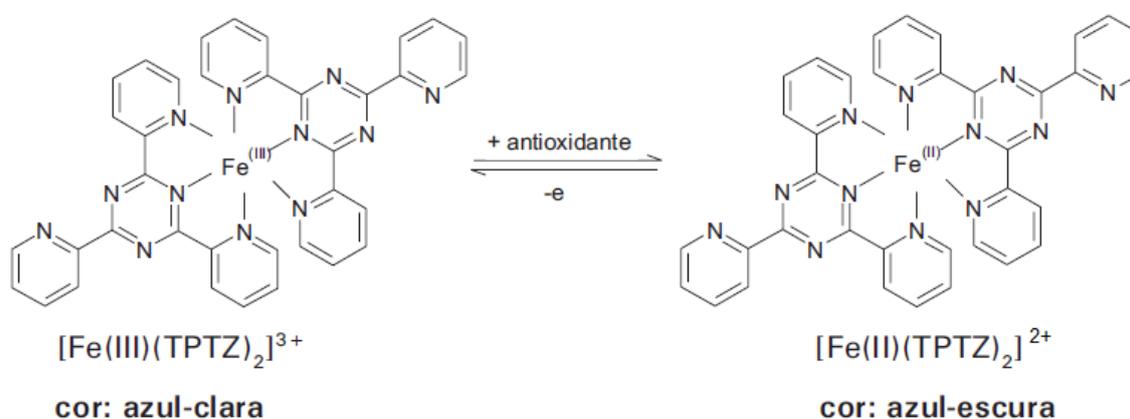


Figura 9 - Redução do complexo TPTZ com Fe^{3+} à Fe^{2+} pela adição de um antioxidante
 Fonte: RUFINO et al., (2006).

3.6.1.4 Método de descoloramento do β -caroteno/ácido linoleico

Esse método tem como principal função avaliar a atividade de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (Figura 10), esses radicais gerados irão abstrair o hidrogênio da molécula insaturada do β -caroteno, assim o método é baseado na descoloração do β -caroteno, induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico (peroxil), que devido a esse ataque perde suas duplas ligações e conseqüentemente sua cor laranja característica (SILVA, 2010). Sendo assim, a atividade antioxidante é avaliada pela adição de uma amostra que contenha antioxidantes que ao reagir com o radical peroxil contribui para retardar a queda de coloração do β -caroteno, conseqüentemente a defesa contra o ataque dos radicais livres (OLDONI, 2007).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA E PREPARAÇÃO DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Os resíduos de bagaço e engaço de uva são provenientes das variedades Bordo, Francesa e Niágara rosada para os resíduos de vinho tinto (RVT) e da variedade Niágara branca para o resíduo de vinho branco (RVB), ambos coletados em uma vinícola de Mariópolis - PR no período de safra da uva – janeiro a fevereiro de 2013. Os resíduos assim que obtidos foram congelados até o momento das análises para garantir todas suas características.

Os resíduos foram descongelados em geladeira durante 24 horas e após foram colocados em estufa a 37°C por 4 dias para completa desidratação e em seguida foram triturados em um moinho de bancada Marconi modelo MA - 630 (Figura 11 e 12) e conservados em freezer para futuras análises.



Figura 11- Resíduo de Vinho Tinto seco e triturado



Figura 12 - Resíduo de Vinho Branco seco e triturado

4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS

Dez gramas de cada material desidratado e moído foram extraídos com 100 mL de etanol a 80 % (v/v), homogeneizados em Incubadora Shaker Modelo SL 222, por 1 hora a 40 °C. Após a filtragem em papel de filtro Watman nº 5, os sobrenadantes dos extratos foram armazenados em freezer para posterior análise. Essa metodologia foi realizada conforme CARPES (2008), com algumas modificações.

4.3 ANÁLISES QUÍMICAS

As análises químicas para avaliação da atividade antioxidante foram realizadas com os RVT, RVB e com os antioxidantes sintéticos eritorbato de sódio, BHA, BHT e o antioxidante natural α -tocoferol, na concentração de 100 ppm, sendo que esses antioxidantes comerciais foram realizados pelo nosso grupo de pesquisa orientado pela prof^a. Dr^a. Solange Teresinha Carpes, nas mesmas condições das

amostras. Todas as análises foram realizadas em triplicada para maior exatidão dos dados.

4.3.1 Determinação de Compostos Fenólicos Totais

A determinação de compostos fenólicos foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocateau, descrito por Singleton et al. (1999). Uma alíquota de 0,5mL dos respectivos extratos foram transferidos para tubos de ensaio e adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocateau (1:10). Após 5 minutos de repouso da mistura, adicionou-se 2,0 mL de uma solução de Na₂CO₃ 4%. As soluções foram incubadas em local escuro, à temperatura ambiente e após 2 horas foi realizada a leitura da absorbância a 740nm. O padrão utilizado foi o ácido gálico e os resultados expressos em mg equivalente em ácido gálico (EAG) / g de amostra.

4.3.2 Determinação de Flavonoides totais

A concentração de flavonoides totais foi determinada conforme método descrito por Park et al. (1995), com algumas modificações. Uma alíquota de 0,5 mL dos extratos foram transferidos para um tubo de ensaio e adicionado 4,3 mL de etanol 80 % (v/v), 0,1 mL de nitrato de alumínio a 10 % (m/v) e 0,1 mL de acetato de potássio 10% (m/v). Após 40 minutos de repouso, as leituras foram feitas em espectrofotômetro, a 415 nm. Tubos em branco foram conduzidos nas mesmas condições, sem adição de nitrato de alumínio e adicionando 4,4 mL de etanol 80% (v/v). A curva analítica foi preparada contendo 10, 25, 40, 70, 85 e 100 ppm de quercetina com os mesmos métodos citados acima e os resultados expressos em mg quercetina / g de amostra.

4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.4.1 Atividade de sequestro do radical DPPH•

A medida da atividade sequestrante do radical DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams et al. (1995). Para avaliação da atividade antioxidante os extratos dos resíduos reagiram com o radical estável DPPH em uma solução de etanol. Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 517 nm, a qual desaparece após a redução pelo hidrogênio arrancado de um composto antioxidante. A mistura de reação foi constituída da adição de 0,5 mL das amostras (extratos), 3 mL de etanol absoluto e 0,3 mL da solução do radical DPPH 0,3 mM em etanol. Os resultados foram expressos como coeficiente de inibição (IC_{50}) no tempo em que atingiu a estabilidade determinada através de uma cinética de reação.

4.4.2 Atividade antioxidante pela oxidação acoplada do beta-caroteno e ácido linoleico

A medida da atividade antioxidante foi determinada pela oxidação acoplada do β -caroteno e do ácido linoleico, de acordo com Ahn et al. (2004). Foram pesados 10 mg de β -caroteno, os quais foram dissolvidos em 100 mL de clorofórmio. Após isto, foi retirada uma alíquota de 3 mL da solução clorofórmio – β -caroteno e adicionada a 40 mg de ácido linoléico e 400 mg de Tween 40. Em seguida, o clorofórmio foi removido com a utilização de uma corrente de gás nitrogênio, e o resíduo obtido redissolvido em 100 mL de água aerada por 30 min. Alíquotas de 3 mL da emulsão β -caroteno/ácido linoléico foram misturadas com 300 μ L dos extratos dos resíduos. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 470 nm, no tempo inicial e em intervalos de 20 minutos durante 2 horas com incubação a 50 °C, para a reação de oxidação. A amostra controle continha 300 μ L de etanol 80%. A atividade antioxidante foi expressa pela porcentagem de inibição relativa em relação ao controle depois de 120 min de incubação, usando a Equação 1:

$$\%AA = (DR_C - DR_S)/DR_C \times 100 \quad (1)$$

Onde %AA representa a atividade antioxidante, DR_C a taxa de degradação da amostra controle ($\ln(a/b)/120$); DR_S a taxa de degradação da amostra contendo a substância teste ($\ln(a/b)/120$); a a absorbância inicial no tempo 0 e b a absorbância depois de 120 min.

4.4.3 Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro - FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Para a determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP) foi utilizada a metodologia descrita por Kukic et al. (2008), com algumas modificações. Esta se baseia na medida direta da habilidade dos antioxidantes (redutores) da amostra em reduzirem, em meio ácido (pH 3,6), o complexo Fe^{3+} /tripiridiltriazina (TPTZ) (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina), para formar Fe^{2+} , de intensa cor azul e absorção máxima a 593 nm.

O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, através da mistura de 25 mL de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5 mL de solução TPTZ (10 mM TPTZ em 40 mM HCl) e 2,5 mL de $FeCl_3$ (20 mM) em solução aquosa. Uma alíquota de 100 μ L dos extratos foram adicionados a 3 mL do reagente FRAP e incubado a 37°C em banho-maria por 30 minutos. As absorbâncias foram medidas após esse tempo e o espectrofotômetro zerado com a solução FRAP. A curva de calibração foi desenvolvida com sulfato ferroso (200 – 2000 μ M), e os resultados expressos em μ mol Fe^{2+} /g de amostra.

4.4.4 Atividade antioxidante frente ao ABTS^{•+}

A capacidade de sequestrar o radical 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-acido sulfônico (ABTS^{•+}) foi determinada segundo o método descrito por Re et al. (1999). O radical ABTS^{•+} foi gerado a partir da reação da solução aquosa de ABTS^{•+}

(7 μmol) com 88 μL de persulfato de potássio 140mM e esta solução foi mantida ao abrigo da luz, em temperatura ambiente por 16 h. Após esse período de reação a solução foi diluída em etanol até obter, em comprimento de onda de 734 nm, uma medida de absorvância de $0,7 \pm 0,05$. Os extratos foram adicionados a solução do $\text{ABTS}^{+\cdot}$, e a absorvância registrada, em comprimento de onda de 734 nm, após 6 minutos em espectrofotômetro UV-VIS. A capacidade antioxidante da amostra foi calculada em relação à atividade do antioxidante sintético Trolox (6- hidroxil-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), nas mesmas condições, e os resultados foram expressos em capacidade antioxidante equivalente ao Trolox ($\mu\text{mol TEAC/g}$ de amostra).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os dados foram tratados através da análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste Tukey para análises com mais de três amostras e pelo teste T para as análises com apenas duas amostras, considerando um nível de significância de 95 % ($p < 0,05$) utilizando o pacote estatístico ASSISTAT 7.6 beta, atualizado em Março/2013.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

A extração com etanol 80% em Shaker por 1 hora a 40 °C proporcionou um extrato homogêneo de coloração bordô para os resíduos do vinho tinto (Figura 13) e marrom claro para os resíduos de vinho branco (Figura 14). Ambos os extratos foram filtrados com bastante facilidade e possuíam odor característico de cada resíduo.



Figura 13 - Extrato etanólico do RVT

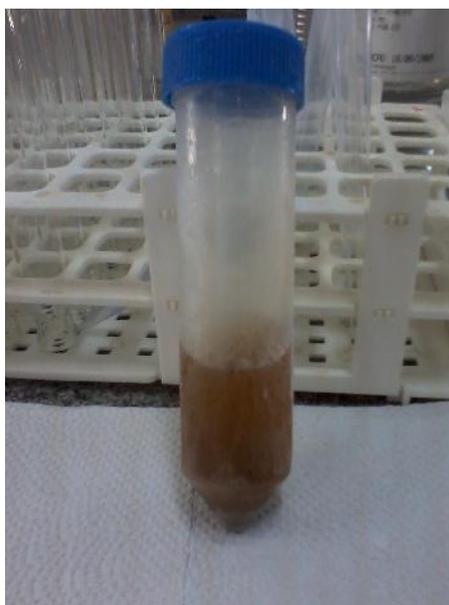


Figura 14 - Extrato etanólico do RVB

5.2 COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES

Atualmente o interesse no estudo dos compostos fenólicos vem crescendo, devido à habilidade antioxidante destas substâncias em sequestrar radicais livres, os quais quando em desequilíbrio são prejudiciais a saúde humana. A determinação do teor de compostos fenólicos totais se faz muito importante, pois vários estudos têm

demonstrado que eles são os principais responsáveis pela atividade antioxidante dos vegetais.

Neste estudo, os compostos fenólicos totais foram quantificados por espectrofotometria, utilizando o ácido gálico como padrão de referência. Este método envolve a oxidação de fenóis por um reagente amarelo de fosfomolibdato e fosfotungstênio (reagente de Folin-Ciocalteu), e a medida colorimétrica de um complexo azul Mo-W que se forma na reação em meio alcalino. O final da análise é representada pela redução do fosfomolibdato-fosfotungstato a molibdênio em meio alcalino, cuja coloração é azul. A equação da curva de calibração obtida com o padrão de ácido gálico foi $y = 0,0227x - 0,0086$ com um coeficiente de correlação de 0,9992, como mostra a figura 15.

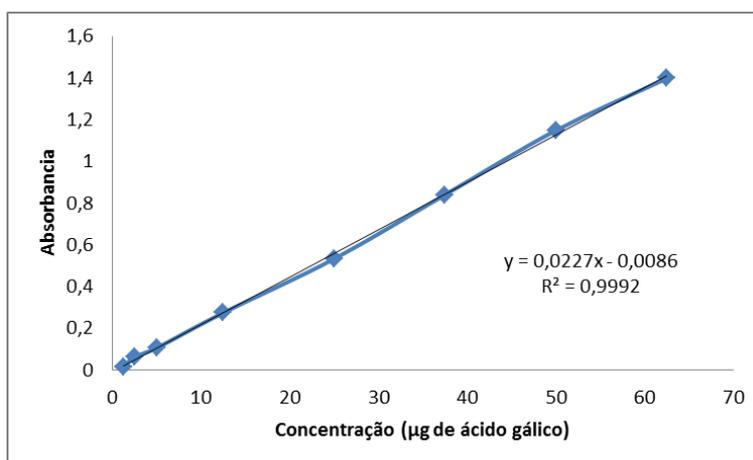


Figura 15 - Curva Padrão de ácido gálico para determinação de compostos fenólicos

Já para quantificação dos flavonoides a análise é baseada na cor característica formada a partir da formação de complexos entre o alumínio presente da reação e os flavonoides. Para construção da curva padrão foi utilizada a quercetina, e esta apresentou uma equação de reta de $y = 239,65x + 3,1466$ com um coeficiente de correlação de 0,9918 (Figura 16).

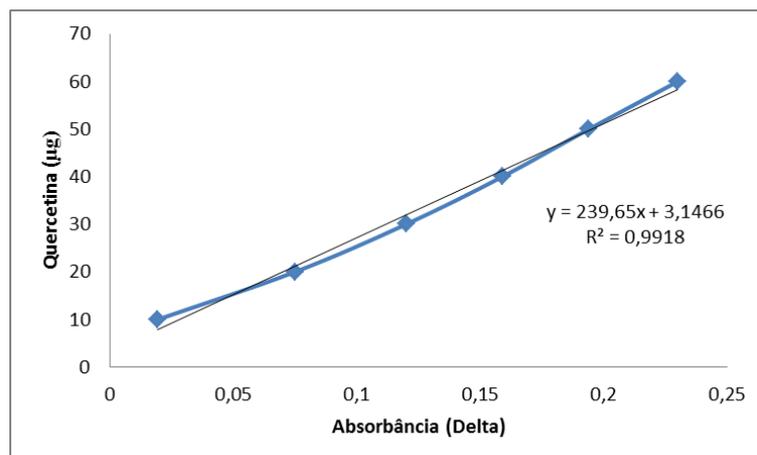


Figura 16 - Curva Padrão de quercetina para quantificação de flavonoides

Os valores dos compostos fenólicos totais e flavonoides totais dos extratos de ervas estão apresentados na tabela 3. O teor de compostos fenólicos obtidos para o RVT e RVB foram de 21,66 mg EAG/g de resíduo e 20,54 mg EAG/g de resíduo, respectivamente, enquanto que para os flavonoides expressos em equivalente de quercetina foram de 0,84 mg quercetina/g de resíduo para o RVT e 0,65 mg quercetina/g de resíduo. O teor de compostos fenólicos totais nos extratos etanólicos dos resíduos do processo de obtenção do vinho tinto e branco não variaram estatisticamente a nível de 5% de significância pelo teste T. Enquanto que houve diferenças estatísticas entre o resíduo de vinho tinto e branco ($p < 0,05$) para análise de flavonoides, sendo que o resíduo de vinho tinto apresentou teores mais elevados que o resíduo de vinho branco (tabela 3). Essa diferença entre os resíduos na análise dos flavonoides pode ser explicada pela alta concentração de antocianinas no resíduo tinto, responsável pela cor característica.

Tabela 3 - Quantificação de compostos fenólicos e flavonoides

Amostras/Análises	Compostos Fenólicos (mg EAG*/g de amostra)	Flavonóides (mg QE**/g de amostra)
RVT	21,66 ± 0,62 ^a	0,84 ± 0,019 ^a
RVB	20,54 ± 0,30 ^a	0,65 ± 0,014 ^b

*Equivalente em ácido gálico. ** Equivalente em Quercetina
Médias seguidas de letras iguais em uma mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste T ($p < 0,05$) n = 3 repetições

O uso do nitrato de alumínio para a determinação da quantidade de flavonoides totais não é um procedimento isento de limitações. O método é preciso, isto é, ele é reproduzível, fornecendo desvios muito pequenos ou nulos entre um ensaio e outro com a mesma amostra. No entanto, ele pode ser pouco exato, ou seja, o valor que ele fornece pode ser diferente (geralmente inferior) em relação à quantidade de flavonoides totais realmente presente na amostra analisada. O valor medido e o valor real são tanto mais próximos entre si quanto maior a proporção de flavonóis na amostra, e tanto mais distantes quanto maior a proporção de flavonas. Isso se deve ao fato de que o comprimento de onda selecionado (415 nm) corresponde à banda de absorção do complexo quercetina-Al (Marcucci et al., 1998). A quercetina é um flavonol, certamente o mais comum dos flavonoides encontrado nas plantas. Os complexos dos outros flavonóis com alumínio absorvem bem próximo de 415 nm, mas os complexos derivados de flavonas absorvem em comprimentos de onda inferiores, o que causa uma subestimativa nas determinações de misturas muito ricas em flavonas (Williams et al., 2004). No entanto, essa limitação não reduz a validade do método, pois normalmente o que se faz é estabelecer limites inferiores e superiores, dentro dos quais os valores encontrados devem se situar nas condições prescritas pelo método.

Em estudos anteriores, Melo et al. (2010) analisaram os compostos fenólicos em extratos de bagaço tinto de uva Isabel, onde foi encontrado 16,57 mg EAG / g, valor próximo encontrado no presente estudo. Cataneo et al. (2008), também analisou resíduos de vinho de diversas variedades de uva, porém com sua extração realizada em acetona 80%, esta apresentou um valor médio inferior ao encontrado neste estudo, sendo 4,20 mg EAG / g. Esta variação pode ser devido a diferença na condição de extração, tipo de solvente e temperatura distinta do processo utilizado nesse trabalho.

Desta forma pode-se afirmar que ambos os resíduos são excelentes alternativas de materiais bioativos por serem ricos em compostos fenólicos e assim ser possível fazer uma relação com a atividade antioxidante.

5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para avaliação da atividade antioxidante foram realizadas 4 análises distintas, sendo elas: atividade de sequestro do radical DPPH expressa pelo IC₅₀, atividade antioxidante frente ao ABTS, atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro (FRAP) e atividade antioxidante pela oxidação acoplada do beta-caroteno/ácido linoleico.

5.3.1 Atividade de sequestro do radical DPPH*

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de diminuir ou prevenir significativamente a oxidação de outra substância, sempre que presente em menor concentração comparado a substância oxidável de interesse (HALLIWELL E GUTERIDGE, 1990; HALLIWELL, 2001). Diversas técnicas têm sido utilizadas para se determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas promissoras. Nota-se um aumento no uso da avaliação da capacidade antioxidante em alimentos, produtos naturais, fármacos e cosméticos. Este interesse começou a se expandir a partir da década de 90, quando começou a ser constatada a influência benéfica de muitos produtos naturais na saúde humana (DEL RÉ E JORGE, 2011).

A evolução da reação cinética depende da natureza do antioxidante a ser testado. Podem ocorrer três tipos de comportamentos cinéticos entre as amostras: cinética rápida, quando reagem rapidamente com o DPPH⁺, atingindo o final da reação em menos de um minuto; cinética intermediária, quando o final da reação é atingido em até trinta minutos; e cinética lenta quando a reação demora mais de uma hora para terminar (CARPES et al., 2008).

Desta forma, fez-se necessária a determinação de cinética dos resíduos analisados, pois há substâncias antioxidantes que reagem de forma diferenciada como, por exemplo, a vitamina C que possui uma cinética rápida e os antioxidantes

sintéticos como BHT e BHA que possuem cinéticas de reação mais lenta. Além disso, os extratos de resíduos de vinhos possuem uma variedade indefinida de compostos com potencial antioxidante e desta forma é imprescindível avaliar o comportamento cinético de cada amostra.

A redução do radical DPPH foi medida através de um monitoramento contínuo do declínio da absorbância a 517 nm com simultânea mudança de coloração, de violeta para amarela, característico de produto reduzido. Concentrações crescentes de extratos dos resíduos de vinhos foram submetidos à reação com DPPH e as absorbâncias lidas a cada 20 minutos até valores estáveis de absorção. As figuras 17 e 18 representam a cinética dos extratos etanólicos do resíduo de vinho tinto (RVT) e vinho branco (RVB).

Analisando os resultados pelo método do DPPH, utilizando o IC_{50} para interpretação dos dados, as respectivas absorbâncias das amostras foram aplicadas na equação (1) possibilitando a determinação da taxa de consumo de DPPH e a construção das curvas cinéticas e a partir dessas verificar o comportamento dos extratos de RVT e RVB em diversas concentrações em função do tempo. As figuras 17 e 18, demonstram esse perfil e comprovam a estabilidade do radical a partir de 60 minutos de repouso, isto é, todo radical que poderia ser reduzido na presença do antioxidante conseguiu ser reduzido em 60 minutos de reação.

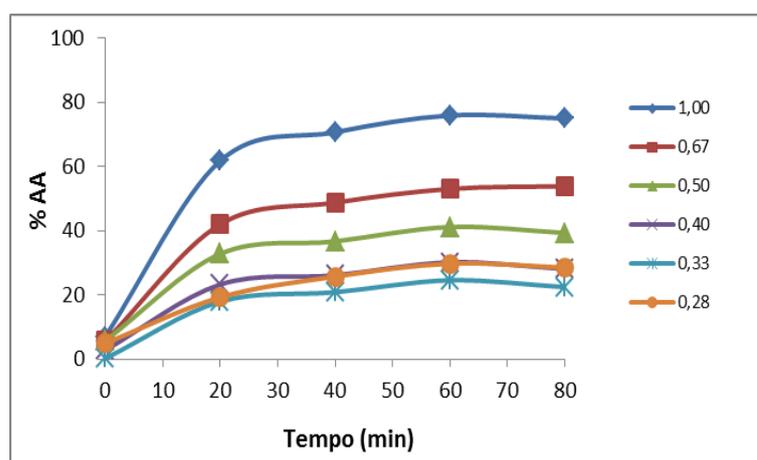


Figura 17 - Curva Cinética para estabilização do sequestro do radical livre frente ao RVT nas concentrações 1; 0,67; 0,50; 0,40; 0,33; 0,28 mg/mL.

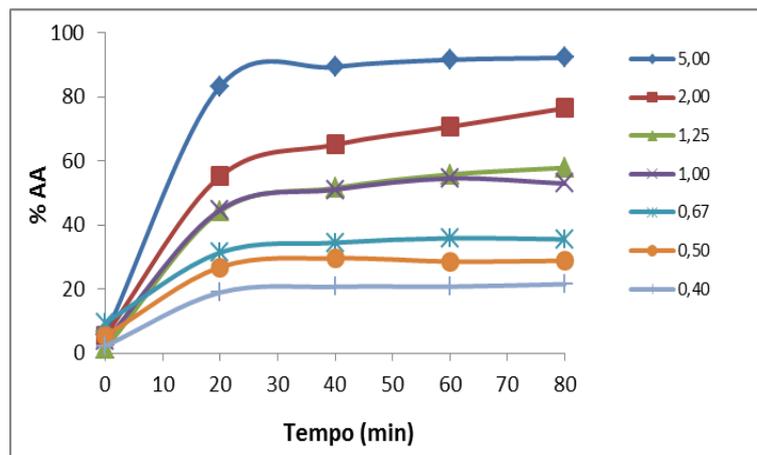


Figura 18 - Curva Cinética para estabilização do sequestro do radical livre frente ao RVB nas concentrações 2; 1,25; 0,67; 0,50; 0,40 mg/mL.

Desta forma, para o cálculo da taxa de consumo de DPPH, a % de AA foi calculada em 60 minutos de reação. Após a avaliação da cinética de reação a atividade antioxidante foi expressa através do IC₅₀, ou seja, a concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% o DPPH inicial da reação no tempo em que o extrato atingiu a estabilidade. Quanto menor o seu valor, maior é a capacidade antioxidante dos extratos e, para simplificar, vários autores (Kroyer e Hegedus, 2001; Meda et al., 2005) expressaram seus resultados em ARP (atividade redutora potencial), ou seja, o inverso da IC₅₀.

As Figuras 19 e 20 mostram o cálculo da meia vida (IC₅₀) por meio das equações de regressão. Partindo-se do princípio de que a reação dos polifenóis com o radical DPPH• é de primeira ordem foram plotados gráficos que expressam a atividade antioxidante pelo tempo utilizando a fórmula usada por Carpes (2008).

$$\%AA = 100 - \left\{ \left[(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100 \right] / Abs_{controle} \right\} \quad (1)$$

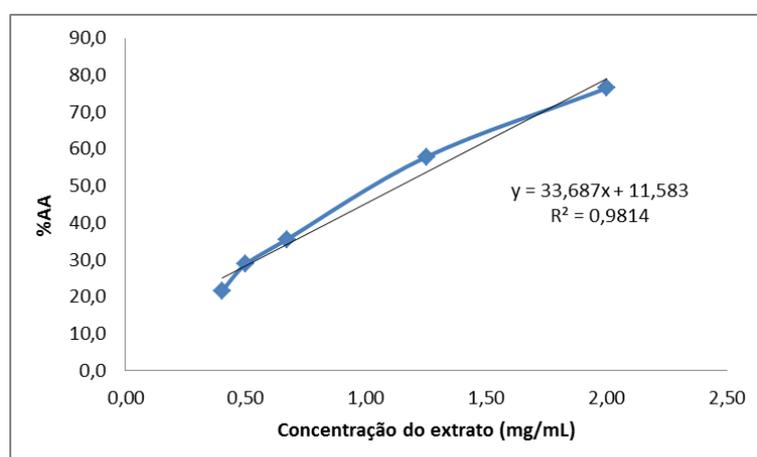


Figura 19 - Gráfico para o cálculo do IC₅₀ = X e Y=50 para o RVB.

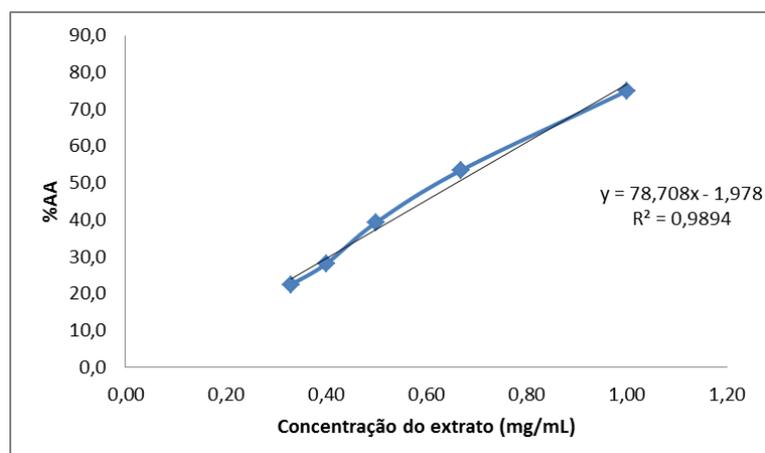


Figura 20 - Gráfico para o cálculo do $IC_{50} = X$ e $Y=50$ para o RVT.

A partir desses dados foi possível encontrar a quantidade mínima de amostra para reduzir a presença do radical em 50 %, sendo de 0,66 mg/mL e 1,14 mg/mL, para os RVT e RVB, respectivamente.

Procedimento semelhante foi realizado com os antioxidantes sintéticos e alfa-tocoferol, onde a partir de uma solução de 100 μ g/mL de cada antioxidante fez-se várias diluições para determinar a cinética da reação e assim como, o valor de IC_{50} .

A tabela 4 apresenta os valores de IC_{50} dos resíduos de vinho e dos antioxidantes comerciais.

Tabela 4 - Resultados da análise do sequestro do radical DPPH

Amostras	IC_{50} (mg/mL)
RVT	$0,660 \pm 0,001^b$
RVB	$1,141 \pm 0,04^a$
Eritorbato de sódio*	$0,049 \pm 0,002^e$
BHT*	$0,112 \pm 0,001^c$
BHA*	$0,072 \pm 0,003^d$
α -tocoferol*	$0,061 \pm 0,002^d$

Médias seguidas de letras iguais em uma mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em relação aos antioxidantes sintéticos, o que se destacou foi o eritorbato de sódio precisando apenas 0,049 mg/mL para reduzir a presença do radical em 50%, seguindo do α -tocoferol, BHA e com menor potencial antioxidante o BHT com 0,11 mg/mL. Em comparação aos antioxidantes, o BHA e α -tocoferol não diferem significativamente, porém ambos se diferem do BHT e eritorbato de sódio.

De acordo com o teste Tukey, os resíduos apresentaram um maior valor numérico de IC_{50} quando comparado aos antioxidantes comerciais, porém, nesta análise temos que lembrar que quanto menor o valor encontrado, maior será a atividade antioxidante, sendo assim a letra “a” no teste de Tukey se refere a amostra com menor atividade antioxidante. Por isso muitos autores, buscando evitar confusões expressam seus resultados em ARP que é o inverso do IC_{50} .

Estudos anteriores demonstraram a excelente atividade antioxidante dos resíduos, Melo (2010), analisou a atividade antioxidante pelo método do DPPH e encontrou para resíduos de vinho tinto uma variação de 0,32 a 0,56 mg/mL enquanto que para resíduos de vinho branco uma variação de 0,20 a 0,31 mg/mL. Outro estudo feito por Ruberto et al. (2007), também avaliou bagaços de cinco variedades de uvas encontraram valores que variaram de 0,014 a 0,038 mg/mL. Diferenças entre estudos são muito comuns devido às diferenças entre os tipos de resíduos, diferenças na origem geográfica e nos métodos de extração, assim como nas particularidades do processo produtivo, bem como maneiras de preparar a reação, entre outros.

O resíduo de vinho tinto mostrou superioridade entre o resíduo de vinho branco, enquanto que o eritorbato de sódio mostrou superioridade entre os antioxidantes comerciais. Todos os antioxidantes comerciais foram superiores aos resíduos por se tratarem de substâncias puras.

5.3.2 Atividade antioxidante pela oxidação acoplada do beta-caroteno e ácido linoleico

Segundo KULISIC et al. (2004) a medida da atividade antioxidante por meio do método de descoloração do β -Caroteno é baseada na perda de cor amarela, devido a reação com radicais formados durante a oxidação do ácido linoleico em

uma emulsão. Neste método, o β -caroteno sofre uma rápida descoloração na ausência de um antioxidante devido a oxidação acoplada do β -caroteno e do ácido linoleico, os quais geram radicais livres. Esses radicais livres atacam as moléculas de β -caroteno altamente insaturadas. Como resultado disso, o β -caroteno é oxidado, as moléculas menores são quebradas e o sistema perde o cromóforo. A descoloração amarelada do β -caroteno pode ser controlada espectrofotometricamente.

No sistema beta-caroteno/ácido linoleico é importante levar em consideração a concentração do extrato, por utilizar uma fórmula, não é possível incorporar no cálculo esse fator. No entanto, após ensaios prévios, a concentração mais adequada para essa análise do β -caroteno tanto para os RVT quanto para os RVB, foram na concentração de 5 mg/mL, isto é, uma diluição 1:20 do extrato bruto. Entretanto, não foi possível usar essa mesma concentração para os antioxidantes comerciais, os quais foram analisados na concentração de 100 ppm (0,1 mg/mL). Desta forma, as amostras dos resíduos e antioxidantes sintéticos foram tratados estatisticamente separados, devido ser analisados em concentrações distintas.

O principal objetivo desta análise é a proteção do beta-caroteno contra a peroxidação do ácido linoleico, sendo assim quanto menor for a redução da densidade óptica da amostra, maior é a atividade antioxidante.

A tabela 5 mostra os resultados da atividade antioxidante dos extratos etanólicos dos resíduos de vinho pelo método do β -caroteno, RVT e RVB, sendo 82,92% e 81,42%, respectivamente. Entretanto, cabe lembrar que não houve diferenças estatísticas entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (tabela 5).

Tabela 5 - Resultados beta-caroteno/ácido linoleico para os resíduos

Amostras	β -catoteno/ácido linoleico
RVT*	82,92 \pm 0,72 ^a
RVB*	81,42 \pm 0,91 ^a

*5mg/mL. Médias seguidas de letras iguais em uma mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste T ($p < 0,05$).

Os resultados deste trabalho foi superior ao encontrado por Melo (2010), que encontrou 72,13 % para resíduo tinto e 64,87 % para resíduo branco, ambos com diluição de 1:10 a partir do extrato bruto.

Já os antioxidantes sintéticos, exemplificados na tabela 6, foram analisados na concentração de 100 ppm, sendo o majoritário eritorbato, seguido do α -tocoferol, BHA e por fim o BHT (tabela 6).

O eritorbato apresentou superioridade e diferenças estatísticas entre todos os antioxidantes comerciais. Os antioxidantes BHA e α -tocoferol, não apresentaram diferença significativa entre eles, porém se diferenciaram do BHT e do eritorbato (tabela 6). No primeiro momento entende-se que os antioxidantes sintéticos contêm uma atividade inferior ao dos resíduos, mas deve-se lembrar da concentração utilizada, sendo esta de 100 ppm, sendo assim, mesmo diluído apresentou uma porcentagem de atividade antioxidante alta, principalmente por se tratar de uma substância pura.

Tabela 6 - Resultados β -caroteno/ácido linoleico para os antioxidantes sintéticos

Amostras	β -catoteno/ácido linoleico
Eritorbato de sódio**	73,68 \pm 0,07 ^a
BHT**	63,68 \pm 0,18 ^c
BHA**	68,06 \pm 0,22 ^b
α -tocoferol**	70,29 \pm 0,17 ^b

**0,1 mg/mL. Médias seguidas de letras iguais em uma mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.3.3 Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro - FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Este método está baseado na capacidade dos fenóis (um antioxidante) em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} (STRATIL ET AL., 2006; HUKKANEN ET AL., 2006) e também se baseia em reações de transferência de elétrons. Quando isso ocorre na presença de 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) e em condições ácidas, a redução é acompanhada pela formação de um complexo corado (azul intenso) com o Fe^{2+} , com uma absorção máxima a 593 nm.

Desta forma, o método FRAP, é muito utilizado para ver o potencial redutor da amostra testada, isto é, quanto mais Fe^{2+} no final na reação, maior será a atividade

antioxidante. A figura 21 mostra a curva padrão com sulfato ferroso e a linearidade com o aumento da concentração de Fe^{2+} na reação.

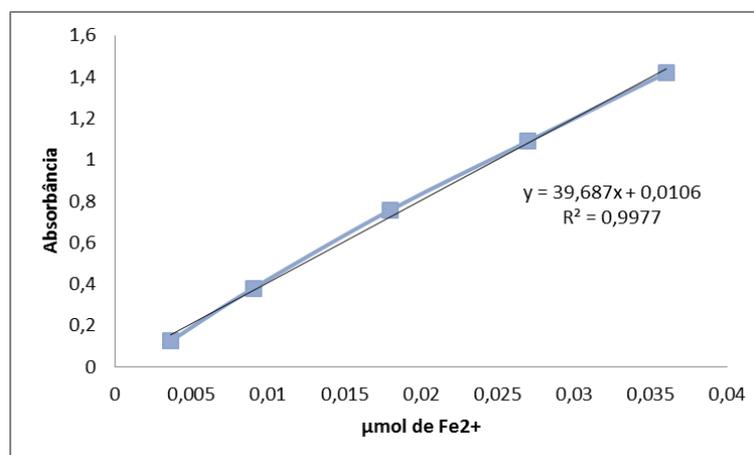


Figura 21 - Curva Padrão de Fe^{2+} para o FRAP

Como exemplificado na tabela 7, os resultados para o RVT foi de 56,29 μmol de Fe^{2+}/g de resíduo e para o RVB de 38,52 μmol de Fe^{2+}/g de resíduo, sendo assim, o RVT conseguiu reduzir maior quantidade de Fe^{3+} em Fe^{2+} do que o RVB.

Os antioxidantes sintéticos apresentaram essa capacidade de redução superior aos resíduos, sendo isso normal devido serem puros e atividade antioxidante reconhecida. Houve diferenças estatísticas pelo teste de Tukey entre todas as amostras analisadas e o eritorbato de sódio mostrou superioridade entre os resíduos e entre os antioxidantes comerciais (tabela 7).

Tabela 7 - Resultados FRAP das amostras RVT e RVB e antioxidantes comerciais

Amostras	FRAP (μmol de Fe^{2+}/g de amostra)
RVT	56,29 \pm 0,22 ^e
RVB	38,53 \pm 0,38 ^f
Eritorbato de sódio*	73,68 \pm 0,07 ^a
BHT*	63,68 \pm 0,18 ^c
BHA*	68,06 \pm 0,22 ^b
α -tocoferol*	70,29 \pm 0,17 ^d

*0,1mg/mL. Médias seguidas de letras iguais em uma mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na literatura, poucos são os relatos dessa análise (FRAP) com resíduos agroindustriais. No entanto, Rockenbach et al. (2008) relataram uma concentração de 746,7 μmol de Fe^{2+}/g e 684,7 μmol de Fe^{2+}/g em extratos acetólicos de bagaços de uva em diversas concentrações, sendo esses dois resultados os maiores encontrados.

Todas as amostras apresentaram diferença significativa, sendo o antioxidante eritorbato de sódio o majoritário e o resíduo de vinha branco o minoritário, em relação a redução do ferro.

5.3.4 Atividade antioxidante frente ao ABTS⁺

A atividade antioxidante também foi avaliada frente ao radical ABTS, onde está sendo cada vez mais utilizado, devido a sua fácil aplicabilidade tanto em amostras hidrofílicas quanto lipofílicas, diferentemente do radical DPPH, o ABTS permite monitorar uma gama maior de compostos bioativos.

O resultado da análise da atividade antioxidante pelo método do ABTS foi expresso em capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC), sendo este um antioxidante sintético análogo a vitamina E, porém solúvel em água.

Nesta análise, a partir da equação da reta (Figura 22) foi possível determinar a atividade antioxidante das amostras e os resultados em μmol de Trolox/g de resíduo e de antioxidantes comerciais estão mostrados na tabela 8.

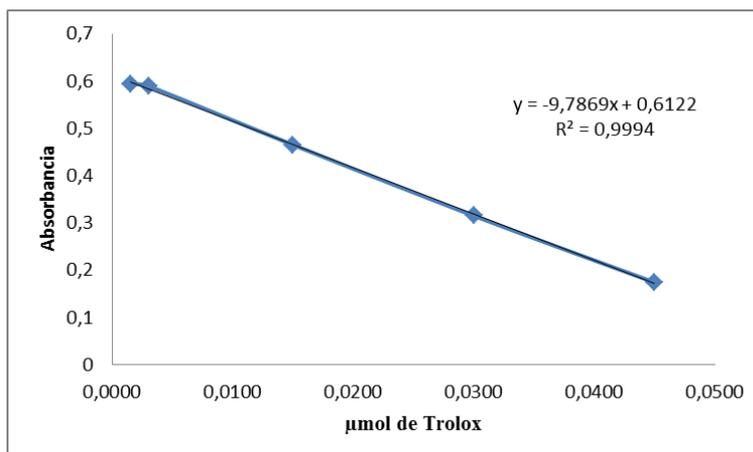


Figura 22 - Curva Padrão do Trolox frente ao radical ABTS

Tabela 8 - Resultados análise do sequestro do radical ABTS

Amostras	ABTS (umol Trolox/g de amostra)
RVT	150,67 ± 0,68 ^c
RVB	145,91 ± 0,60 ^c
Eritorbato de sódio*	5025,41 ± 158,23 ^{a,b}
BHT*	4277,33 ± 73,53 ^b
BHA*	4743,04 ± 66,37 ± 0,22 ^b
α-tocoferol*	5270,03 ± 97,27 ^a

*0,1mg/mL. Médias seguidas de letras iguais em uma mesma coluna não estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O RVT novamente foi numericamente superior ao RVB, sendo de 150,67 umol de Trolox/g de amostra e de 145,91 umol de Trolox/g de amostra, respectivamente, não houve diferenças estatísticas entre eles pelo teste de Tukey e também entre o eritorbato de sódio e o α-tocoferol, assim, foram os que apresentaram maior atividade antioxidante entre as amostras analisadas. O eritorbato de sódio também não se diferenciou do BHT e BHA, provavelmente devido as semelhanças das estruturas desses compostos.

Melo (2010), também estudou atividade antioxidante de resíduos agroindustriais pelo método ABTS e seus resultados variaram 114,60 a 511,97 umol Trolox/g para resíduos tintos e 266,08 até 384,55 umol Trolox/g de amostra para resíduos brancos. Estudos com extratos etanólicos 70% em resíduos também foram estudados por Rockenbach et al. (2008), os quais encontraram 389,9 umol Trolox/g

de amostra. Essas variações podem ser devido as diversas origens geográficas, tipos de uvas utilizadas, entre outros. Entretanto, todos comprovam a efetividade dos resíduos como excelente opção para atividade antioxidante.

6 CONCLUSÃO

Analisando os resultados apresentados ao longo deste estudo o resíduo de vinho tinto apresentou-se superior ao resíduo de vinho branco, mas com uma diferença discreta entre eles, confirmando o potencial antioxidante de ambas as amostras testadas.

Ambas as amostras apresentaram valores expressivos de compostos fenólicos, porém os flavonoides tiveram valores um pouco mais baixos, podendo atribuir essa fator, pela maior presença de ácidos fenólicos que flavonoides nas amostras. O teor de compostos fenólicos não apresentou diferença significativa entre os resíduos, ao contrário do teor de flavonoides, onde o resíduo de vinho tinto mostrou superioridade ao resíduo de vinho branco com diferença significativa entre eles pelo teste de T.

Em relação a atividade antioxidante apresentada em 4 métodos distintos, pode-se afirmar que os resultados foram satisfatórios, porém inferiores ao antioxidante comerciais testados, sendo isto esperado devido ser uma substancia pura e com alta atividade antioxidante já reconhecida, porém ao utilizar eles é necessário ter cautela, visto que esses antioxidante sintéticos já estão proibidos na Europa e Estados Unidos e no Brasil seu uso tem restrições, devido aspectos toxicológicos e carcinogênicos.

Desta forma, a substituição desses antioxidantes sintéticos por produtos naturais com a mesma atividade, proporcionaria uma melhor qualidade dos alimentos e utilizando resíduos provenientes da fabricação de inúmeros produtos, como o vinho, é uma excelente alternativa para dar um destino mais nobre a esses resíduos que possuem excelentes constituintes nutricionais e compostos bioativos. Além do destino adequado também existe a possibilidade de agregar valores para esses resíduos, ajudando economicamente as indústrias agroindustriais e proporcionando alimentos mais saudáveis utilizando aditivos naturais.

REFERÊNCIAS

AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; BANG, K. S.; NAKAYAMA, T. Antioxidant Activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 24, p. 7286-7292, nov. 2004.

ALVESI, Clayton Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, vol.33 , nº 10, pag , 2010.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; PATSALIDES E. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst** 127: 183-198, 2002.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, p. 113-123, 2006.

BECKER, E.M; NISSEN, L. R; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 219, p. 561-571, 2004.

BERGAMASCHI, K. B. **Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento**. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft Und-Technologie**, v. 28, p.25-30, 1995.

BRASIL. Legislação (1988). Legislação Portaria nº 229, de 25 de outubro de 1988. **Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho**. Disponível em: http://www.uvibra.com.br/legislacao_portaria229.htm Acesso em: 05 jan. 2014.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutricional Significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n.11, p. 317 – 333, 1998.

CAMARGO, U.A.; MAIA J. D.G.; RITSCHKEK, P. Novas cultivares brasileiras de uva. Bento Gonçalves: **Embrapa Uva e Vinho**, 64p, 2010.

CATANEIO, C.B.; CALIARI V.; GONZAGA L. V.; KUSKOSKI E.M.; FETT, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Seminário: Ciências agrárias**, Londrina, v. 29, n.1, p. 93 – 102, jan./mar. 2008.

CARPES, S. T. **Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região Sul do Brasil**. 2008. 255 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CARPES, S.T. PRADO, A.; MORENO, I.A.M.; ALENCAR, S.; MASSON, M.L. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região Sul do Brasil. **Química Nova**, v.31, n.7, p. 1660-1664, 2008.

CASAROTTO, Julie. **Uso de antioxidantes naturais na preservação do estado oxidativo de salsinhas**. 2013. 121f. Dissertação (mestrado em ciência e tecnologia de alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

CLEYTON, M.S. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, 2007.

DEL RÉ, P.V.; JORGE, N. Antioxidant potential of oregano (*Oreganum vulgare* L.), basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.): application of oleoresins in vegetable oil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 4, p. 955-959, 2011.

DEWICK, P. M. The biosynthesis os shikimate metabolites. **Natural Products Report**. Cambridge, v.15, n. 1, p. 15-58, 1998.

FERRARI, V. **A sustentabilidade da vitivinicultura através de seus próprios resíduos**. 2010, 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Econômicas) Universidade de Caxias do sul, 2010.

JAFARI, S.M., ASSADPOOR, E., BHANDARI, B., HE, Y. Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. **Food Research International**, Amsterdam, vol.41, pp.172– 183, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Rradicals in Biology and Medicine**. 3 ed. Clarendon, Oxford, NY.254p, 2000.

HALLIWELL, B. **Free radicals and other reactive species in disease.** In: Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group, p. 1-7, 2001.

HARBORNE, J.B. **Procedures and measurement of total phenolics.** In: Methods in Plant of Biochemistry. Harborne J.B. Ed. Academic Press, London, UK., p. 1-28, 1989.

JORDÃO, A.M.; SILVA, R.; LAUREANO, O. Influência da rega na composição fenólica das uvas tintas da casta Touriga francesa (*Vitis vinífera* L.). **Revista Ciência e Tecnologia em Alimentos. Reynosa**, v.2, n.2, p. 60-73, 1998.

KUKIC, J., Kukića J., Popovića V., Petrovića S., Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. **Food Chem.**, v. 107, n. 2, p. 861-868, 2008.

KROYER, G.; HEGEDUS, N. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.2, p.171-174, 2001.

KULISIC, T., RADONIC, A., KATALINIC, V., MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, v.85, n.4, p.633-640, 2004.

LEE, YUNHO., YOON, JEYONG. Spectrophotometric determination of ferrate (Fe(VI)) in water by ABTS. *Science Direct*, 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004313540500093X> Acesso em: 17 jul. 2013.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. *Mensagem doce*, v. 46, p.13-18, 1998.

MARIUTTI, L.R.B.; BRAGAGNOLO, N. Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae. Aplicação em Produtos Alimentícios. **Brazilian Journal of Food and Technology**, v. 10, n. 2, p. 96- 103, 2007

MEDA, A.; LAMIEN, C.E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O.G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, n.3, p.571-577, 2005.

MELLO, L. M. R. Vitivinicultura brasileira: panorama 2010. Bento Gonçalves: **Embrapa Uva e Vinho**. 4p., 2010.

MELO, P. S. **Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais**. 2010. 101f. Dissertação (mestrado em ciência e tecnologia de alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

MENEZES, Anderson Chierato de. A química do vinho. UOL, Bebedouro-SP, jun.2010. Disponível em:
<http://www.aquimicadovinho.xpg.com.br/etap_fabrica.html> Acesso em: 16 jan. 2014.

MERCADANTE, A. Z. et al. Effect of natural pigments on the oxidative stability of sausages stored under refrigeration. **Meat Science**, v. 84, p. 718-726, 2010.

MONTEIRO, J.M.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; ARAUJO, E.L.; AMORIM, E.L.C. taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Quim. Nova**, v. 28, n. 5, p.892-896, 2005.

NATIVIDADE, M.M.P. **Desenvolvimento, caracterização e aplicação tecnológica de farinhas elaboradas com resíduos da produção de suco de uva**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência de alimentos). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

OLDONI, Tatiane L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie Apis milifera**. 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimento) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

PARK, Y. K., KOO, M. H., SATO, H. H., CONTADO, J. L. Survey of some components of propolis which were collected by Apis mellifera in Brazil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Vol. 38, p. 1253-1259, 1995.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 3396-3402, 2000.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755 – 760, 2006.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANDA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends Plant Science**, London, v. 2, n.4, p. 152-159, 1997.

ROCKENBACH, I .I., et al. 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, p. 174 – 179, 2011.

ROCKENBACH, I.I.; SILVA, G.L.; RODRIGUES, E.; KUKOSKI, E.M.; FETT, R. Influência do solvent no conteúdo total de polifênóis, antocioninas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinífera*) variedades *Tannat* e *Ancelota*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p.238-244, dez., 2008.

RUBERTO, G; RENDA, A.; DAQUINO, C., AMICO, V.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C.; DE TOMMASI, N. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. **Food Chemistry**, Barking, v. 100, p. 203-210, Jan., 2007.

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

SASSO, Cristian et al. Vinhos. **UFSC**, Santa Catarina. Disponível em: <http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_grad2004/vinho/pagina_final.htm> Acesso em: 16 jan. 2014.

SILVA, M. L. C.; SANTANA, A. S.; COSTA, R. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SIMÕES, C.M.C.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3 ed. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. UFSC/ Ed. UFRGS, 2001. 833p.

SINGLETON, V. L. et al. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, Vol. 299, pp. 152–178, 1999.

TEIXEIRA, FELIPE DE A.; SILVA, CARMELIRA G. DA.,.DPPH. **Química Nova Interativa**. Disponível em: http://qnint.s bq.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=4J4NcOscwSWQozPv_U900znaLVcJT9yuEtosdRR6-OUaLje9-uzD1r0zo9HWIFgxKcELr89FjeGeQhTJYPGT2Q Acesso em: 17 jul. 2013.

UVIBRA – União Brasileira de Vitivinicultura. Disponível em: http://www.uvibra.com.br/pdf/safra_uva2003-2012.pdf. Acesso em: 17 nov. 2013.

WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules. **Free Radical Biology and Medicine**, v.36, n.7, p. 838-849, 2004.