



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS**

**COMPOSTOS FENÓLICOS, ÁCIDOS GRAXOS E CAPACIDADE  
ANTIOXIDANTE DO BAGAÇO DA VINIFICAÇÃO DE UVAS TINTAS**  
*(Vitis vinifera L. e Vitis labrusca L.)*

Ismael Ivan Rockenbach

Florianópolis

2008

**Ismael Ivan Rockenbach**

**COMPOSTOS FENÓLICOS, ÁCIDOS GRAXOS E CAPACIDADE  
ANTIOXIDANTE DO BAGAÇO DA VINIFICAÇÃO DE UVAS TINTAS  
(*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Ciência dos Alimentos.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Roseane Fett**

Florianópolis

2008

## AGRADECIMENTOS

Ao Mestre dos Mestres, o Senhor Deus, pela força, confiança e benção.

À Professora Dra. Roseane Fett pela oportunidade concedida, pela acolhida, pelo estímulo, consideração e amizade.

À família, pai Selmar, mãe Jacinta e irmã Daniele, que foram o porto seguro nos momentos de insegurança, que sempre acreditaram na minha capacidade e que me apoiaram incondicionalmente. Muito obrigado!

Ao amigo e Professor da graduação Raul Vicenzi, pelo estímulo, apoio e encaminhamento.

Aos amigos Fábio e Lílian Brod, pela acolhida e pela amizade, pelos chimarrões e pelo apoio que nunca faltou.

Ao colega Eliseu pela parceria e por todos os objetivos alcançados com sua ajuda. Pela dedicação e comprometimento com este trabalho.

Ao técnico, amigo, e “guru” do laboratório Luciano Valdemiro Gonzaga pela amizade e parceria nas análises. Pela convivência e experiência transmitida.

À pesquisadora, amiga e instrutora Eugênia Marta Kuskoski pelos primeiros aprendizados nas metodologias, incentivo e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação pela oportunidade concedida e pelo apoio.

Ao pesquisador Vinícius Caliari da Estação Experimental de Videira da EPAGRI, Santa Catarina, pela viabilização das amostras para o trabalho.

Ao secretário Sérgio pelo apoio burocrático e amizade.

Aos colegas de turma Estela, Karina, Jéferson, Ana Cristina, Fabiane, Júnior, colegas de laboratório Melissa, Érika, Márcia, Ciriele, Lucas, Graciela Lessa, Fred, Camila e Analú, e aos colegas de Pós-Graduação pela convivência e amizade.

Às primas Ana Paula e Monique e aos amigos Fábio e Nádia, pela parceria e amizade.

Ao Professor Dr. Jorge Mancini Filho, técnica Rosângela Pavan e doutorando Alessandro Lima da USP pela parceria nas análises.

Aos Professores Gustavo Micke e Marcelo Maraschin pelos esforços para a identificação de compostos fenólicos.

À CAPES pela concessão da bolsa e a todos que de alguma forma contribuíram na minha caminhada os mais sinceros agradecimentos.

*“Se chorei ou se sorri, o importante é que emoções eu vivi”*

Roberto Carlos

ROCKENBACH, I. I. **Compostos fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante do bagaço da vinificação de uvas tintas (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.)**. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

## RESUMO

A vitivinicultura no Brasil está concentrada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste, sendo uma atividade consolidada e com significativa importância sócio-econômica. Em Santa Catarina, a vitivinicultura apresenta expressão econômica principalmente na região do Vale do Rio do Peixe, onde a maior parte da produção de uvas destina-se à elaboração de vinhos de mesa. Esta importante atividade econômica gera grandes quantidades de resíduos sólidos, como o bagaço de uva, os quais são descartados ou subaproveitados. O objetivo deste trabalho foi avaliar o conteúdo de compostos fenólicos, atividade antioxidante, estabilidade das antocianinas e a composição em ácidos graxos do óleo extraído do bagaço de uva de diferentes variedades *Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L. produzidas na região de Videira, Santa Catarina. Na primeira etapa do trabalho foi otimizada a metodologia de extração, onde foram avaliados diferentes sistemas solventes de acetona e etanol. Também foi realizada a avaliação da estabilidade das antocianinas do resíduo seco e desengordurado obtido a partir de bagaços de uva. Determinou-se ainda o perfil de ácidos graxos do bagaço de todas as variedades de uva utilizadas e foram identificados os ácidos fenólicos presentes no bagaço de algumas variedades. A quantificação de compostos fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu e quantificação dos ácidos fenólicos por cromatografia gasosa, antocianinas monoméricas totais pelo método de diferença de pH e atividade antioxidante pelos métodos ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfônico), DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazila), FRAP (poder antioxidante de redução do ferro) e sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. Na otimização da extração verificou-se que o sistema solvente acetona, nas concentrações de 50 e 70 % em meio aquoso, apresentou maior eficiência na extração de compostos fenólicos totais, na atividade antioxidante e no poder redutor, enquanto que os sistemas solventes alcoólicos apresentaram maior teor de antocianinas monoméricas totais extraídas e maior eficiência na inibição do processo de oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. Com o extrato etanólico observou-se maior sinergismo na aplicação conjunta de extratos de bagaço de uva e BHT. A estabilidade das antocianinas, avaliada no período de 298 dias, mostrou tempos de meia-vida de 1680 e 1306 dias para as variedades Ancelota e Tannat; e de 868 e 343 dias para as variedades Regente e Pinot Noir. O óleo do bagaço de todas as variedades de uvas avaliadas apresentou uma composição de ácidos graxos com alta concentração em ácido linoléico (47,63 a 60,02 %) e oléico (9,48 a 16,81 %). Na avaliação dos ácidos fenólicos dos bagaços de uva verificaram-se teores expressivos de ácido protocatecuico nas frações de ácidos fenólicos livres e de ácido gálico nas frações de ácidos fenólicos esterificados. Observou-se correlação significativa entre o teor de fenólicos totais e atividade antioxidante, e entre atividade antioxidante e teor de ácidos fenólicos. Assim, os bagaços das diferentes variedades apresentam grande potencial como fonte de compostos fenólicos antioxidantes e de corantes naturais.

Palavras-chave: bagaço de uva, compostos fenólicos, atividade antioxidante.

ROCKENBACH, I. I. **Phenolic compounds, fatty acids and antioxidant capacity of red grape (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) pomace**. 2008. 112 p. Dissertation (Master Degree in Food Science) – Agricultural Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, 2008.

## ABSTRACT

The wine production in Brazil is located mostly in Southern, Southeastern and Northeastern regions, being a well-established and of significant social and economical importance. In Santa Catarina state, vitiviniculture presents economical expression mainly in Vale do Rio do Peixe where majority of grape production is destined to table wine manufacture. This important economical activity produces high amounts of solid residues such as pomace which is discarded or misused. The aim of this work was to evaluate the content of phenolic compounds, antioxidant activity, anthocyanin stability and fatty acid composition of the oil extracted from grape pomace of different varieties of *Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L. produced in the region of Videira, Santa Catarina. As a first step, extraction methodology was optimized by testing different solvent systems of acetone and ethanol. Evaluation of anthocyanin stability was carried out in dried and defatted residue obtained from grape pomace. Fatty acid profile was also determined for all grape varieties tested. Phenolic acids present in of some varieties were identified too. Quantification of total phenolic compounds was determined by Folin-Ciocalteu method and quantification of phenolic acids was performed by gas chromatography. Total monomeric anthocyanins was determined by pH difference and antioxidant activity by ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic acid), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhidrazil radical), FRAP (ferric reducing antioxidant power) and  $\beta$ -carotene/linoleic acid system methods. In optimization of extraction it was verified that acetone, in concentrations of 50 % and 70 % in aqueous system, presented higher yield in extracting total phenolic compounds and in antioxidant activity and reducing power while alcoholic systems presented higher monomeric anthocyanin contents and efficiency in inhibiting oxidation of  $\beta$ -carotene/linoleic acid system. Ethanolic extract presented higher synergism on concomitant application of grape pomace extract and BHT. Anthocyanin stability, evaluated during 298 days, presented half-life times of 1680 and 1306 days for Ancelota and Tannat varieties and of 868 and 343 days for Regente and Pinot Noir varieties. Pomace oil of all grape varieties evaluated presented a fatty acid composition with high amounts of linoleic (47.63 % to 60.02 %) and oleic (9.48 % to 16.81 %) acids. Evaluation of phenolic acids from grape pomaces showed expressive contents of protocatechuic acid in fractions of free phenolic acids and of galic acid in fractions of esterified phenolic acids. It was observed a significant correlation between total phenolic content and antioxidant activity and between antioxidant activity and phenolic acids content. Thus, pomaces from different varieties present large potential as a source of antioxidant phenolic compounds and of natural colorants.

Key-words. grape pomace, phenolic compounds, antioxidant activity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Separação do bagaço de uva durante a vinificação.....	13
Figura 2. Distribuição majoritária dos principais compostos fenólicos na uva.....	14
Figura 3. Estrutura genérica das moléculas dos flavonóides.....	17
Figura 4. Estrutura genérica das maiores classes dos flavonóides.....	17
Figura 5. Exemplos de ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b).....	19
Figura 6. Estrutura química da antocianina majoritária das uvas: a malvidina-3-glicosídeo.....	20
Figura 7. Atividade antioxidante dos extratos acetônico, etanólico e metanólico do bagaço de uva variedade Regente determinada pela oxidação acoplada do $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.....	68
Figura 8. Atividade antioxidante dos extratos acetônico, etanólico e metanólico do bagaço de uva variedade Pinot Noir determinada pela oxidação acoplada do $\beta$ -caroteno/ ácido linoléico.....	69
Figura 9. Rendimento de extratos de bagaço de uva (média e intervalo de confiança, $P < 0,05$ ).....	100
Figura 10. Correlação entre o conteúdo total de fenólicos e atividade antioxidante pelo método ABTS e pelo método DPPH e entre o conteúdo total de fenólicos e o poder redutor pelo método FRAP.....	103
Figura 11. Poder de inibição da oxidação de extratos de bagaço de uva e BHT (butil hidroxitolueno) a 100 ppm pelo sistema de co-oxidação de substratos $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. C = Cabernet Sauvignon; M = Merlot; B = Bordô; I = Isabel.....	105

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos fenólicos totais de extratos de bagaço de uva (g GAE.100g <sup>-1</sup> peso seco).....	47
Tabela 2. Antocianinas totais de extratos de bagaço de uva (g.100g <sup>-1</sup> peso seco).....	48
Tabela 3. Atividade antioxidante e Poder Redutor (µMol.g <sup>-1</sup> ) em peso seco de extratos de bagaço de uva.....	50
Tabela 4. Percentual de inibição da oxidação pelo sistema de co-oxidação de substratos β-caroteno/ácido linoléico.....	52
Tabela 5. Conteúdo de polifenóis totais (PT) e Atividade antioxidante (ABTS e DPPH) de extratos de bagaço de uva variedade Pinot Noir (solventes a 50% em meio aquoso acidificado com HCl 0,1% v/v).....	66
Tabela 6. Conteúdo de polifenóis totais (PT) e Atividade antioxidante (ABTS e DPPH) de extratos de bagaço de uva variedade Regente (solventes a 50% em meio aquoso acidificado com HCl 0,1% v/v).....	66
Tabela 7. Estabilidade do Conteúdo de Fenólicos Totais (FT) e Atividade Antioxidante (TEAC) de bagaços de uva ( <i>Vitis vinifera</i> L.) após 298 dias.....	79
Tabela 8. Perfil de Ácidos Graxos (%) da fração lipídica de amostras de bagaço de uva ( <i>Vitis vinifera</i> L.).....	88
Tabela 9. Conteúdo de Fenólicos Totais (FT), Antocianinas Monoméricas Totais (AMT), Atividade Antioxidante (ABTS e DPPH) e Poder Redutor (FRAP) de extratos de bagaços de uvas tintas ( <i>Vitis vinifera</i> L. e <i>Vitis labrusca</i> L.).....	101
Tabela 10. Concentrações de ácidos fenólicos (mg.g <sup>-1</sup> ) de bagaços de uvas tintas das variedades C. Sauvignon, Merlot, Bordô e Isabel.....	106



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>11</b>
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	11
1.1 VITIVINICULTURA E SEUS SUBPRODUTOS .....	12
1.2 COMPOSTOS FENÓLICOS .....	15
1.2.1 Flavonóides .....	16
1.2.2 Ácidos fenólicos.....	18
1.2.3 Antocianinas .....	20
1.3 RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES .....	21
1.4 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS .....	24
1.5 ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	25
1.6 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	27
1.6.1 Método ABTS.....	28
1.6.2 Método DPPH .....	29
1.6.3 Método FRAP.....	29
1.6.4 Método da co-oxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.....	30
1.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	30
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>40</b>
INFLUÊNCIA DO SOLVENTE NO CONTEÚDO TOTAL DE POLIFENÓIS, ANTOCIANINAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE BAGAÇO DE UVA ( <i>VITIS VINIFERA</i> L.) VARIEDADES TANNAT E ANCELOTA .....	40
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>60</b>
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE BAGAÇO DE UVA DAS VARIEDADES REGENTE E PINOT NOIR ( <i>VITIS VINIFERA</i> L.) .....	60
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>73</b>
ESTABILIDADE DE ANTOCIANINAS, COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE BAGAÇOS DE UVA ( <i>VITIS VINIFERA</i> L.) .....	73
<b>CAPÍTULO 5.....</b>	<b>84</b>
PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE BAGAÇOS DE UVAS TINTAS ( <i>VITIS VINIFERA</i> L. E <i>VITIS LABRUSCA</i> L.).....	84
<b>CAPÍTULO 6.....</b>	<b>92</b>
COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE BAGAÇOS DA VINIFICAÇÃO DE UVAS TINTAS ( <i>VITIS VINIFERA</i> L. E <i>VITIS LABRUSCA</i> L.).....	92
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>112</b>

## INTRODUÇÃO

A crescente demanda por alimentos seguros vem sendo fortemente acompanhada pela busca por processos limpos de produção, acarretando para a indústria de alimentos custos cada vez maiores para o tratamento dos resíduos líquidos e sólidos que são gerados. Esse é o caso da indústria vinícola, que responde por um volume substancial de resíduos orgânicos sólidos: o bagaço de uva como subproduto representa aproximadamente 20% das uvas colhidas (LAUFENBERG, KUNZ e NYSTROEM, 2003).

A uva, após a laranja, é a fruta de maior produção mundial, com mais de 61 milhões de toneladas ao ano, cultivadas principalmente como *Vitis vinifera* para a produção de vinho (SCHIEBER, STINTZING e CARLE, 2002). Os principais subprodutos da vinificação são separados durante as etapas de esmagamento e prensagem das uvas, e apenas pequenas quantidades desses resíduos são valorizados ou aproveitados (TORRES et al., 2002). A recuperação de compostos a partir dos desperdícios contínuos da indústria de vinho poderia representar um avanço significativo na manutenção do equilíbrio do meio ambiente, visto que nas vinícolas as grandes quantidades de resíduos gerados apresentam sérios problemas de armazenagem, de transformação, ou de eliminação, em termos ecológicos e econômicos. Esta situação explica o interesse crescente em explorar os subprodutos da vinificação (ALONSO et al., 2002).

Em comparação aos estudos químicos envolvendo os constituintes dos vinhos, o bagaço de uva tem sido muito pouco investigado, sendo, no entanto, rico em polifenóis (AMICO et al., 2004), que são considerados compostos bioativos, ou seja, constituintes extra-nutricionais que ocorrem tipicamente em pequenas quantidades nos alimentos e possuem efeitos para a saúde (KRIS-ETHERTON et al., 2002). É de conhecimento científico o potencial antioxidante dos polifenóis, atuando como redutores de oxigênio singlete, na inibição das reações de oxidação lipídica e na quelação de metais. Além disso, apresentam uma ampla gama de propriedades farmacológicas, como anti-alergênicas, anti-arteriogênicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, anti-trombóticas e também efeitos cardioprotetores e vasodilatadores (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2001; MANACH, MAZUR e SCALBERT, 2005). Estudos clínicos e epidemiológicos têm mostrado evidências de que antioxidantes fenólicos de cereais, frutas e vegetais são os principais fatores que contribuem para a significativa redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas encontradas em

populações cujas dietas são altas na ingestão desses alimentos. Por este motivo, a importância da pesquisa sobre antioxidantes naturais tem aumentado muito nos últimos anos (ROESLER et al., 2007).

Os antioxidantes sintéticos, como BHT (butil hidroxitolueno), BHA (butil hidroxianisol) e TBHQ (terc-butil-hidroxiquinona), são usados em muitos alimentos para inibir a oxidação química de seus componentes. No entanto, a preocupação cada vez maior dos consumidores em relação a estes aditivos sintéticos tem motivado a investigação acerca de novas fontes e dos benefícios de antioxidantes naturais como seus possíveis substituintes nos alimentos (FORMANEK et al., 2001). Neste contexto, os compostos fenólicos presentes nos resíduos industriais da vinificação justificam o aproveitamento deste resíduo, pela agregação de valor e pela contribuição na diminuição do impacto ambiental provocado pelo seu descarte, além dos seus benefícios para a saúde.

Na literatura a grande maioria dos trabalhos avaliou o potencial antioxidante e os compostos fenólicos das partes constituintes do bagaço separadamente, como sementes, cascas e engaços. Em contrapartida, outras partes do conjunto das uvas que são rejeitadas durante o processo de vinificação, como os engaços, recebem muito menos atenção, embora contenham grande quantidade de polifenóis (SOUQUET et al., 2000). Poucos estudos focalizam o potencial antioxidante do bagaço em sua totalidade (ALONSO et al., 2002; LOULI, RAGOSSIS e MAGOULAS, 2004). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antioxidante do bagaço de uva resultante da produção de vinho na região vinícola de Videira, Santa Catarina, conhecida como região do Vale do Rio do Peixe, abrindo novos mercados para a aplicação desse subproduto agroindustrial, agregando valor ao mesmo e oferecendo assim uma nova possibilidade de aproveitamento deste resíduo agroindustrial.

## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## **1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1 VITIVINICULTURA E SEUS SUBPRODUTOS**

No Brasil a exploração vitivinícola é uma atividade bastante antiga, conforme demonstram os registros de cultivo de uva pelos jesuítas no Estado do Rio Grande do Sul, no século XVII. Em 1864, a vitivinicultura foi introduzida em Santa Catarina, sendo que o início do cultivo na principal região produtora do Estado, o Vale do Rio do Peixe, data do ano de 1913, ocorrendo uma intensificação a partir de 1930, notadamente pelos colonizadores de origem italiana que imigraram do Rio Grande do Sul (ROSIER e LOSSO, 1997).

Atualmente a produção de uvas e vinhos no Brasil está concentrada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste, sendo uma atividade consolidada e com significativa importância sócio-econômica. Aproximadamente 50 % da produção nacional de uvas é destinada à elaboração de vinhos, sucos e outros derivados. Neste contexto, os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina respondem, respectivamente, por 90 e 5 % da produção nacional de vinho, destacando-se como os maiores produtores. Em Santa Catarina, a maior parte da produção destina-se a elaboração de vinhos de mesa, com aumento na área plantada de 18,04 % em 2006. Nesse estado a vitivinicultura apresenta expressão econômica principalmente na região do Vale do Rio do Peixe, que possui grande similaridade com a região da Serra Gaúcha quanto à estrutura fundiária, topografia e tipo de exploração vitícola. A área média das propriedades dessa região é de aproximadamente 30 ha, sendo destes 2,14 ha com vinhedos. São propriedades com áreas acidentadas, nem sempre aproveitáveis integralmente para a agricultura. Em 2007, a produção de uvas no Brasil foi de 1.354.960 toneladas, 11,04 % superior ao ano de 2006. Houve redução na produção de uvas nos estados de São Paulo e em Minas Gerais. Nos demais estados ocorreu aumento na produção. O maior acréscimo da produção ocorreu no estado da Bahia, seguido pelos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Do total de uvas produzidas no Brasil em 2007, 47,02 % foram destinados à elaboração de vinhos, sucos e outros derivados, 35,35 % a mais que em 2006, quando o total da uva destinada ao processamento representou 38,32 %. (MELLO, 2000, 2007 e 2008).

Como consequência da expressiva atividade agroindustrial brasileira, assim como em outros setores, os produtores e indústrias da área vitivinícola enfrentam o problema de

descarte da biomassa residual, que, embora seja biodegradável, necessita de um tempo mínimo para ser mineralizada, constituindo-se numa fonte de poluentes ambientais. Dados da indústria mostram que para 100 L de vinho produzidos geram-se 31,7 kg de resíduos, dos quais 20 kg são de bagaço (CAMPOS, 2005). Dessa forma existe atualmente um interesse crescente na exploração dos resíduos gerados pela indústria do vinho, que na maioria das vezes são descartados ou subaproveitados (ARVANITOYANNIS, LADAS e MAVROMATIS, 2006).



Figura 1. Separação do bagaço de uva durante a vinificação.

Os subprodutos da vinificação são identificados como sendo o bagaço, as sementes, o folhelho, o engaço, as borras e o sarro. O bagaço (Figura 1) é originado da prensagem das matérias-primas da vinificação, constituídas pelas partes sólidas das uvas e pelo mosto. Como resíduo da prensagem, o bagaço representa 12 a 15 % em peso da matéria-prima inicial, contendo na sua composição açúcares e outros glicídios, proteínas e, nas sementes, um elevado teor de lipídios. Em relação à composição química do bagaço ocorre uma grande variação de acordo com a natureza das castas de onde ele provém, a forma de vinificação, condições atmosféricas que presidem a vegetação da vinha, tendo marcada influência na

composição das uvas, os sistemas de condução da vinha e o estado sanitário das uvas no momento da vindima, o que influencia também a composição dos seus subprodutos (SILVA, 2003).

O bagaço de uva representa uma importante fonte de óleo. As sementes de uva possuem de 10 a 20% de óleo, que é especialmente rico em ácidos graxos insaturados. Ácidos graxos poliinsaturados, como os ácidos linoléico e linolênico, são essenciais para o corpo humano porque este não é capaz de sintetizá-los. Desta forma, o óleo das sementes e do bagaço de uva, rico em ácido linoléico, pode representar uma fonte valiosa de óleo dietético (GÖKTÜRK BAYDAR, ÖZKAN e ÇETIN, 2007).

Além de representar uma importante fonte de óleo, os subprodutos da vinificação são caracterizados pelo elevado conteúdo de compostos fenólicos (NEGRO, TOMMASI e MICELI, 2003; KAMMERER et al., 2004; GONZALEZ-PARAMAS et al., 2004). A uva é uma das maiores fontes de compostos fenólicos. Os principais fenólicos presentes na uva são os flavonóides (antocianinas, flavanóis e flavonóis), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos) e uma larga variedade de taninos (FRANCIS, 2000). A distribuição dos principais compostos fenólicos nas uvas está representada na Figura 2.

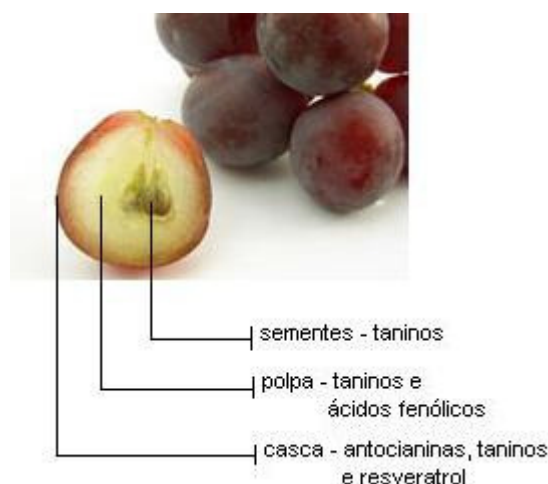


Figura 2. Distribuição majoritária dos principais compostos fenólicos na uva.

Os compostos fenólicos presentes nas uvas passam para o vinho com intensidade que depende das características do processo de vinificação. Mas, independentemente desta transferência, e considerando que a maior parte destes compostos é encontrada nas partes

sólidas da uva, uma grande proporção permanece nos resíduos ou subprodutos da vinificação (ALONSO et al., 2002).

## 1.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

Uma importante característica das plantas é sua capacidade de sintetizar uma grande diversidade de compostos com baixo peso molecular, denominados metabólitos secundários, que apresentam um papel essencial ou não ao metabolismo vegetal. Aproximadamente 20 a 30 % dos vegetais superiores têm sido investigados quanto aos seus constituintes do metabolismo secundário, permitindo a elucidação da estrutura química de cerca de 50.000 compostos (DE LUCA e ST PIERRE, 2000).

Os compostos do metabolismo secundário são substâncias que geralmente não fazem parte do metabolismo básico da planta e possuem características químicas muito variadas e, às vezes, bastante complexas (TAIZ e ZEIGER, 1998). Durante muito tempo acreditou-se que os metabólitos secundários fossem produzidos sem uma função específica, simplesmente como produtos finais das reações e/ou erros do metabolismo. Esta visão tem mudado substancialmente, na medida em que descobertas sobre a função desses compostos, notadamente em relação aos processos de desenvolvimento vegetal, e seu papel como mediadores das interações entre as plantas e outros organismos têm sido alcançadas (ESABIO, 2002).

No metabolismo secundário das plantas são gerados os compostos fenólicos, que se encontram largamente distribuídos nas plantas e constituem um grupo muito diversificado de fitoquímicos derivados da fenilalanina e tirosina. Englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas, e são essenciais para o crescimento e reprodução das mesmas. Além disso, estes compostos se formam em condições de estresse, como infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outras (BRAVO, 1998; NACZK e SHAHIDI, 2004). Historicamente foram considerados como componentes antinutricionais, porque alguns, como os taninos, eram apresentados como tendo efeitos adversos ao metabolismo humano. No entanto, recentemente, o reconhecimento das propriedades antioxidantes destes compostos tem evocado uma nova visão em direção aos efeitos benéficos para a saúde que estes compostos podem apresentar (KAUR e KAPOOR, 2001).



Os compostos fenólicos são incluídos na categoria de neutralizadores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autoxidação. Em alimentos, são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa. As principais fontes de compostos fenólicos são frutas cítricas, como limão, laranja e tangerina, além de outras frutas como cereja, uva, ameixa, pêra, maçã e mamão, sendo encontrados em maiores quantidades na polpa do que no suco da fruta (ANGELO e JORGE, 2007).

Quimicamente, os fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (LEE et al., 2005). Os compostos fenólicos de maior ocorrência natural apresentam-se conjugados com mono e polissacarídeos, através de um ou mais dos grupos fenólicos, e podem também ocorrer como derivados funcionais, como ésteres e metil ésteres. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos depende da sua estrutura, particularmente do número e posição dos grupos hidroxila e da natureza das substituições nos anéis aromáticos. Existem cerca de 8.000 diferentes compostos fenólicos, que de acordo com sua estrutura química são divididos em classes: ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e taninos. Dentre as classes de compostos fenólicos presentes em plantas e reconhecidos como componentes da dieta estão principalmente os flavonóides e os ácidos fenólicos (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006).

### **1.2.1 Flavonóides**

Os flavonóides constituem o maior grupo de compostos fenólicos de plantas. São polifenóis que ocorrem naturalmente em alimentos de origem vegetal e são comuns em dietas do mundo inteiro. Ocorrem quase que exclusivamente em plantas superiores, onde são responsáveis pela coloração das flores e dos frutos. Existem também relatos de sua presença em algumas algas e fungos (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003).

São compostos de baixo peso molecular, consistindo de 15 átomos de carbono arranjados em uma configuração C6-C3-C6. Sua estrutura consiste essencialmente de dois anéis aromáticos A e B ligados por uma ponte de três carbonos, usualmente na forma de anel heterocíclico (Figura 3). O anel aromático A é derivado da via metabólica do acetato/malonato, enquanto que o anel B é derivado da fenilalanina através da via metabólica do shikimato. Variações nas configurações de substituição do anel C resultam na maioria das

subclasses dos flavonóides: flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanóis e antocianinas. (Figura 4) (MERKEN e BEECHER, 2000; HOLLMAN e ARTS, 2000; BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006). Na dieta se consome principalmente flavonóides glicosilados que são classificados em antocianinas, flavanóis (catequinas), flavonas, flavanonas, e flavonóis. Flavonóides têm demonstrado atividade contra alergias, hipertensão, viroses, inflamações, artrites, mutações e carcinogênese, câncer e AIDS (MERKEN e BEECHER, 2000; KATSUBE et al., 2003).

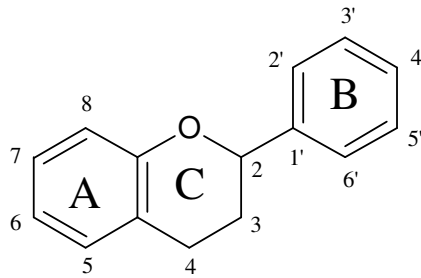


Figura 3. Estrutura genérica das moléculas dos flavonóides.

Fonte: BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006.

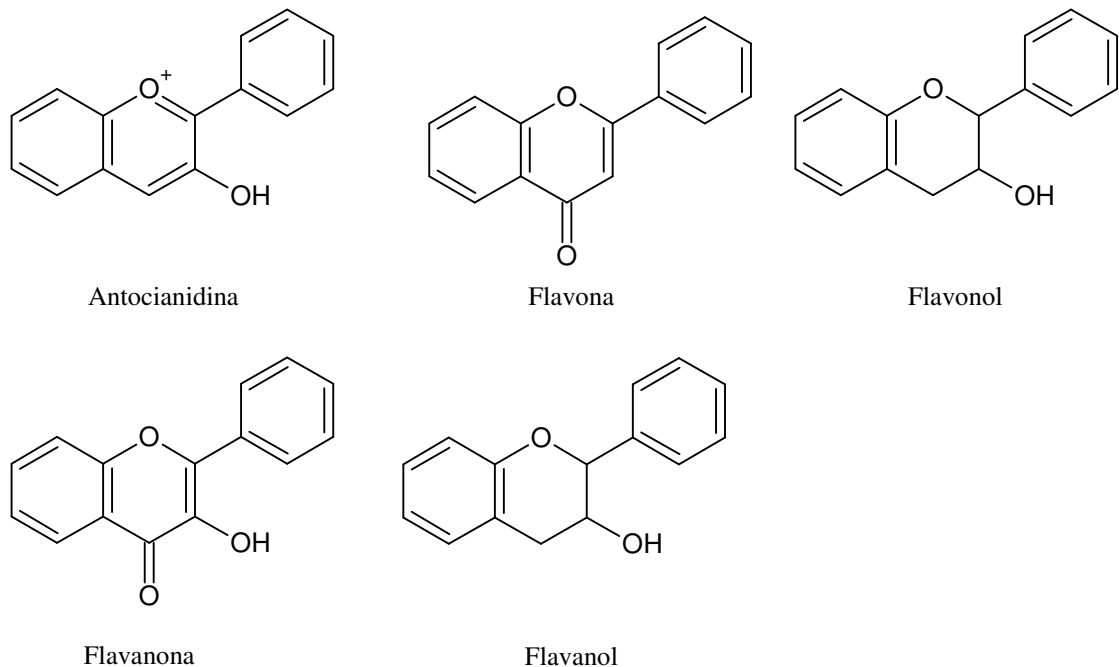


Figura 4. Estrutura genérica das maiores classes dos flavonóides.

Fonte: BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006.

Os flavonóides, particularmente as antocianinas, são efetivos doadores de hidrogênio. Seu potencial antioxidante é dependente do número e da posição dos grupos de hidrogênio e suas conjugações, e também devido à presença de elétrons nos anéis benzênicos (MILLER e RICE-EVANS, 1997; CAO, SOFIC e PRIOR, 1997). Mas as relações de estrutura e atividade dos flavonóides são geralmente mais complicadas que, por exemplo, as dos ácidos fenólicos, devido à relativa complexidade das moléculas dos flavonóides. Dois exemplos disso são: a presença de grupos hidroxila nas posições 3, 4 e 5 do anel B tem sido descrita como responsável por aumentar a atividade antioxidante dos flavonóides em comparação a dos compostos com apenas um grupo hidroxila. No entanto, em algumas condições, tais compostos podem agir como pró-oxidantes, agindo contra o efeito antioxidante. A conversão do composto 3,4-dihidroxifenil para 3,4,5-trihidroxifenil, por exemplo, aumenta a atividade antioxidante para antocianidinas mas diminui a atividade para as catequinas. Outro exemplo é a substituição de grupos hidroxila no anel B por grupos metoxila, que altera o potencial redox, afetando a capacidade de captura de radicais livres dos flavonóides (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006).

### 1.2.2 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são compostos simples formados por um anel aromático e os substituintes ligados à sua estrutura, conferindo capacidade de seqüestrar espécies reativas, como o radical hidroxila e o oxigênio singleto (MARINOVA e YANISHLIEVA, 2003). São divididos em dois grupos. O primeiro é composto pelos ácidos hidroxibenzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C6-C1) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. Incluem os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e siríngico. O segundo é formado pelos ácidos hidroxicinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C6-C3), sendo sete os mais comumente encontrados no reino vegetal. Incluem os ácidos caféico, ferúlico, *p*-cumárico e sinápico (Figura 5). Os ácidos fenólicos, além de se apresentarem sob sua forma livre, podem também estar ligados entre si ou com outros compostos (BRAVO, 1998; SOARES, 2002).

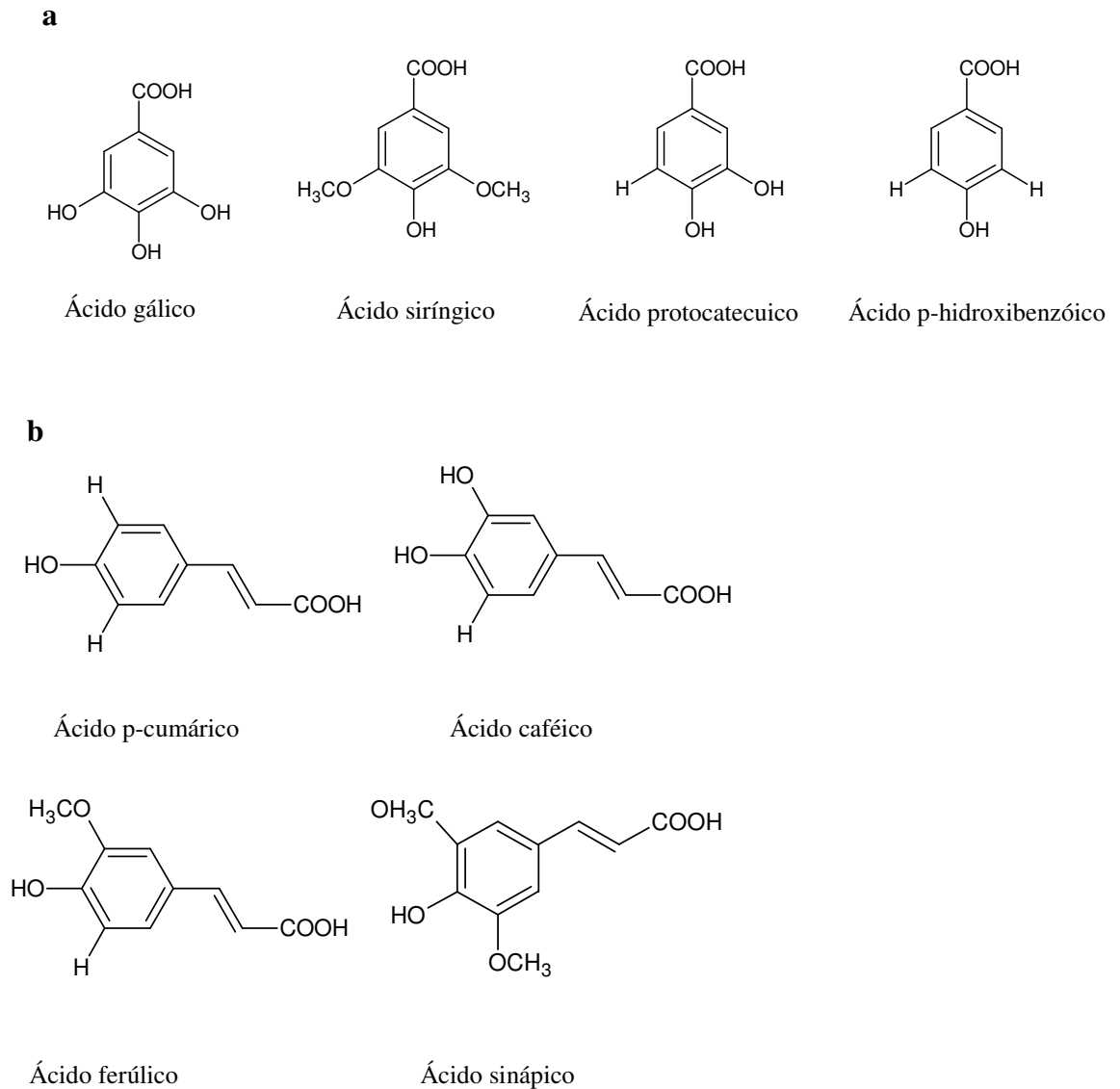


Figura 5. Exemplos de ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b).

Fonte: BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006.

A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos depende do número e posição de grupos hidroxila em relação ao grupo funcional carboxila. Ácidos monohidroxibenzóicos com o grupo OH ligado nas posições *orto* ou *para* em relação ao grupo COOH não apresentam atividade antioxidante, porém, isso não acontece para o ácido *m*-hidroxibenzóico. A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos aumenta com o aumento do grau de hidroxilação, como é o caso do trihidroxilado ácido gálico, que apresenta alta atividade antioxidante. Em contrapartida, a substituição dos grupos hidroxila nas posições 3 e 5 por grupos metoxila, como no caso do ácido siríngico, reduz a atividade. Os ácidos hidroxicinâmicos apresentam maior atividade antioxidante que os ácidos hidroxibenzóicos correspondentes. Isso pode ser devido ao grupo CH=CH-COOH, que garante maior habilidade de doar íons H<sup>+</sup> e estabilizar radicais que o grupo COOH (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006).

### 1.2.3 Antocianinas

As antocianinas são flavonóides que se encontram largamente distribuídos na natureza e são responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e quase todas as tonalidades de vermelho que aparecem em flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas (VINSON et al., 1999). Nas videiras, as antocianinas se acumulam nas folhas durante a senescência e são responsáveis pela coloração das cascas das uvas tintas, sendo encontradas também na polpa de algumas variedades de uvas (RENAUD e DE LORGERIL, 1992). Os conteúdos de antocianinas nas uvas variam de acordo com a espécie, variedade, maturidade, condições climáticas e cultivar (MAZZA, 1995; SHAHIDI e NACZK, 1995).

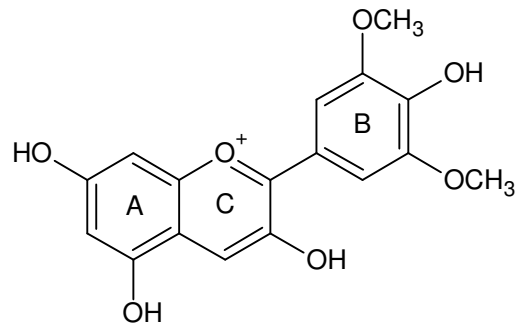


Figura 6. Estrutura química básica das antocianinas.

As antocianinas estão presentes também em diferentes alimentos, com destaque para os vinhos tintos, sendo, portanto, um constituinte comum na dieta humana. Seu uso como corante tem sido de grande interesse devido a suas características e propriedades, e atualmente muito mais devido a sua capacidade antioxidante. E levando-se em conta que os antioxidantes sintéticos podem apresentar efeitos adversos para a saúde, a substituição destes por derivados de produtos naturais pode ser uma opção muito importante (KUSKOSKI et al., 2004).

O potencial antioxidante das antocianinas pode chegar a ser duas vezes maior que os antioxidantes disponíveis comercialmente como, por exemplo, a (+)-catequina e outros compostos como vitamina E (SEERAM et al., 2002), podendo chegar a apresentar melhor atividade antioxidante que o butil hidroxianisol (BHA) e o butil hidroxitolueno (BHT) (ESPÍN et al., 2000). Além disso, as antocianinas têm uma aparente habilidade por serem fortemente polares e poderem substituir os antioxidantes lipofílicos como, por exemplo, a vitamina E (RAMIREZ-TORTOZA et al., 2001).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos, como os flavonóides, ácidos fenólicos e antocianinas, é devido à habilidade desses compostos de doar elétrons ou átomos de hidrogênio, ou quelar cátions metálicos, ou de capturar radicais livres (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006).

### 1.3 RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES

Os radicais livres são classificados como moléculas orgânicas, inorgânicas ou átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, tendo estas moléculas existências independentes (BOYCE, 1999). Esse tipo de estrutura faz com que os radicais livres sejam moléculas de alta instabilidade, tendo meia-vida curta e sendo muito reativos. Levando-se em consideração a manutenção de muitas das funções fisiológicas normais, a presença dos radicais livres é crítica (POMPELLA, 1997).

Estas espécies promovem uma oxidação prejudicial que pode danificar membranas e conteúdos celulares. As LDLs (lipoproteínas de baixa densidade) são partículas formadas por lipídios, colesterol e proteínas em geral, e que podem se oxidar por ação dos radicais livres. Em um fenômeno em série, conseqüentemente, podem afetar as moléculas do colesterol e dos ácidos graxos que compõe cada LDL (HALLIWELL, 2003). Radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, e o seu alvo celular (proteínas, lipídios, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (YU e ANDERSON, 1997). Estão associados às doenças degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, queda do sistema imunológico, disfunções cerebrais, catarata, entre outras, devido aos danos oxidativos que provocam no DNA, proteínas e outras macromoléculas que são acumuladas com a idade. São geralmente menos estáveis do que os compostos não-radicaais, embora suas reatividades variem (ARUOMA, 1994; CHEUNG, CHEUNG e OOI, 2003).

Apesar dos seres humanos dependerem da oxidação biológica como fonte de energia para a sobrevivência e atividade, a ação do oxigênio é ambígua. A reatividade poderosa das espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o radical superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ), pode causar danos funcionais ao homem (HAMID et al., 2002). Os danos oxidativos aos tecidos biológicos são modulados por muitos fatores, incluindo a composição do substrato, concentração de oxigênio e pró-oxidantes. A formação

de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos. Contudo, na condição de pró-oxidante a concentração desses radicais pode aumentar devido a maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes (CERUTTI, 1994). O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres tem sido chamado de estresse oxidativo (DÁVALOS, GOMEZ-CORDOVÉS e BARTOLOMÉ, 2003).

O estresse oxidativo tem como principal consequência a peroxidação lipídica, que desencadeia uma série de mudanças nos sistemas biológicos, tais como a ruptura das membranas celulares (bombas Na/K e Ca/Mg), mutações na estrutura do ácido desoxirribonucléico (DNA), oxidação dos lipídeos insaturados, formação de resíduos químicos como o malondialdeído, comprometimento de componentes da matriz extracelular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999) e apoptose (CHIDAMBARA-MURTHY, JAYAPRAKASHA e SINGH, 2002). Um número crescente de estudos sugere que o estresse oxidativo é fator etiológico crucial no desenvolvimento e agravamento de algumas doenças crônicas humanas como: diabete mellitus, catarata, doença de Parkinson, danos cerebrais na doença de Wilson, doença de Alzheimer, isquemia cerebral, esclerose lateral amiotrófica, ataxia de Friedreich, câncer, aterosclerose, artrite, doenças neurodegenerativas e no aceleração do processo de envelhecimento (HERMES-LIMA, 2004).

Levando-se em consideração esses fatores, a identificação de compostos antioxidantes, substâncias que quando presentes em baixas concentrações em comparação à concentração de uma substância oxidável retardam ou inibem a velocidade de oxidação de biomoléculas, vem despertando grande interesse, uma vez que tais compostos podem manter o equilíbrio dinâmico entre a produção de oxidantes e a concentração de compostos antioxidantes, minimizando danos oxidativos no organismo (CHIDAMBARA-MURTHY, JAYAPRAKASHA e SINGH, 2002).

Antioxidantes são compostos químicos com capacidade de reagir com os radicais livres e assim restringir seus efeitos maléficos ao organismo. São substâncias que retardam a velocidade de oxidação, através de um ou mais mecanismos, como inibição de radicais livres e complexação de metais. Assim, os possíveis mecanismos antioxidantes são: alteração da

produção de radicais; eliminação de precursores de radicais; quelação de metais; e elevação dos níveis de antioxidantes endógenos (PIMENTEL, FRANCKI e BOIAGO, 2005).

Os antioxidantes podem ser classificados em primários, que atuam como doadores de prótons, impedindo o processo de iniciação desencadeado pelos radicais livres. Nesta classe de antioxidantes encontramos os compostos fenólicos, o tocoferol, os aminoácidos, os carotenóides e os antioxidantes sintéticos. A maioria dos flavonóides tem a capacidade de reagir com radicais livres e exercer funções antioxidantes no organismo. Os antioxidantes podem também ser classificados como secundários, atuando no bloqueio da decomposição dos peróxidos e hidroperóxidos e convertendo-os na forma inativa por ação de agentes redutores, bloqueando a reação em cadeia através da captação de intermediários reativos como os radicais peroxila e alcooxila. Nesta classe estão os antioxidantes sintéticos, as vitaminas A, C e E, e também os compostos fenólicos (DONELLI e ROBINSON, 1995; PIETTA, 2000).

Antioxidantes também têm sido apresentados como tendo função conservadora em alimentos. Eles têm sido definidos pelo FDA (*US Food and Drug Administration*) como substâncias usadas para conservar os alimentos pelo retardamento da deterioração, rancidez ou descoloração causada pela oxidação. A peroxidação lipídica é uma importante reação deteriorativa dos alimentos durante o processamento e armazenamento. Substâncias tóxicas formadas pela peroxidação lipídica podem levar a efeitos adversos como carcinogênese, mutação do DNA celular e envelhecimento. Antioxidantes, portanto, de acordo com seu modo de ação, também têm sido classificados como os compostos que neutralizam a cadeia de radicais livres na oxidação lipídica pela doação de elétrons ou de átomos de hidrogênio às gorduras que contém um radical livre, para a formação de um complexo entre a cadeia lipídica e o radical. Antioxidantes interrompem a cadeia de radicais livres das reações oxidativas doando hidrogênios dos grupos fenólicos hidroxila, formando eles mesmos radicais livres estabilizados que não iniciam ou propagam futuras oxidações lipídicas (*Free radical terminators*). Alguns dos importantes antioxidantes sintéticos desta classe são o butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), *tert*-butilhidroxiquinona (TBHQ), propil galato (PG) e tocoferóis. Quando testados em óleos comestíveis e em produtos à base de peixe, carne e aves, extratos ricos em compostos fenólicos têm demonstrado atividade antioxidante comparável a dos antioxidantes sintéticos. (KAUR e KAPOOR, 2001; BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006).



Nem toda a atividade antioxidante é conferida por interceptadores de radicais livres. Agentes redutores que transferem átomos de hidrogênio também têm sido classificados como eliminadores de oxigênio (*oxygen scavengers*). Alguns desses são sulfitos, ácido ascórbico, glicose oxidase e ácido eritórbito. Para serem efetivos em alimentos eles precisam ser adicionados durante a fabricação ou nos produtos acabados. Nenhum antioxidante individualmente oferece proteção contra a deterioração oxidativa em todos os produtos alimentares. A seleção de um antioxidante apropriado é determinada pela compatibilidade entre o efeito do antioxidante e as propriedades alimentares do produto. Tocoferol e ácido ascórbico têm sido extensivamente utilizados como antioxidantes naturais, mas sua atividade é bem menor que a dos antioxidantes sintéticos (KAUR e KAPOOR, 2001).

Embora os antioxidantes sintéticos sejam amplamente utilizados pela indústria alimentícia, existem alguns argumentos com relação a sua segurança e efeitos adversos destas substâncias quando usadas como aditivos alimentares. Enquanto isso, os antioxidantes naturais como as vitaminas e os polifenóis podem apresentar papéis importantes na prevenção de doenças associadas aos radicais livres (SOARES, ANDREAZZA e SALVADOR, 2003).

#### **1.4 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS**

A extração de compostos fenólicos de materiais vegetais é influenciada pela natureza química desses compostos, pelo método de extração empregado, pelo tamanho das partículas da amostra, pelo tempo de armazenamento e condições, bem como pela presença de substâncias interferentes (NACZK e SHAHIDI, 2004).

A solubilidade dos fenólicos é governada por sua natureza química na planta, que pode variar de substâncias simples até altamente polimerizadas. Há a possibilidade de interação dos fenólicos com outros componentes da planta, como carboidratos e proteínas. Estas interações podem levar a formação de complexos que podem ser quase insolúveis. A solubilidade dos fenólicos também é afetada pela polaridade dos solventes utilizados. Portanto, é muito difícil desenvolver um procedimento de extração apropriado para a extração de todos os fenólicos. Os extratos fenólicos de materiais vegetais são sempre uma mistura diversificada de fenólicos solúveis no sistema solvente utilizado (NACZK e SHAHIDI, 2006). Solventes como metanol, etanol, propanol, acetona, acetato de etila e suas combinações têm sido utilizados para a

extração de compostos fenólicos, freqüentemente com diferentes proporções de água (ANTOLOVICH et al., 2000).

O tempo de extração e fatores relacionados também influenciam a extração de compostos fenólicos de materiais vegetais. Prolongados tempos de extração aumentam a chance de oxidação dos fenólicos, a menos que agentes redutores sejam adicionados ao sistema solvente. Além disso, a razão amostra/solvente também influencia diretamente a recuperação de compostos fenólicos de plantas (NACZK e SHAHIDI, 2004).

Krygier, Sosulski e Hogge (1982) propuseram um método de extração de ácidos fenólicos livres e esterificados usando uma mistura dos solventes metanol, acetona e água (7:7:6, v/v/v) à temperatura ambiente. No método sugerido por estes autores os ácidos fenólicos livres são extraídos com éter etílico e o extrato é então tratado com NaOH 4 M sobre nitrogênio para liberação de ácidos fenólicos esterificados. O hidrolisado é acidificado e os ácidos fenólicos liberados são extraídos com éter etílico. O resíduo da primeira extração exaustiva com a mistura metanol, acetona e água também é tratado com NaOH 4 M sobre nitrogênio para a liberação de ácidos fenólicos esterificados insolúveis.

Antocianinas também são freqüentemente extraídas de materiais vegetais, como os resíduos de uva, sendo usualmente utilizados solventes orgânicos acidificados, mais comumente o metanol. Este sistema solvente destrói as membranas celulares, dissolvendo simultaneamente as antocianinas e estabilizando-as (NACZK e SHAHIDI, 2006).

## **1.5 ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS**

Diferentes métodos de análise de polifenóis têm sido publicados (ANTOLOVICH et al., 2000; TSAO e DENG, 2004). No entanto, a estratégia analítica apropriada para o estudo de fenólicos bioativos em vegetais depende do propósito do estudo bem como da natureza da amostra e do analito. Os métodos utilizados para a análise de fenólicos podem ser classificados como aqueles que quantificam o conteúdo total de fenólicos ou como aqueles que determinam um grupo específico ou classe de compostos fenólicos (ROBARDS, 2003).

Assim como a extração, a quantificação de compostos fenólicos também é influenciada pela natureza química dos compostos, pelo método de extração empregado,

tamanho das partículas das amostras, tempo e condições de armazenamento, bem como pelo método de análise, seleção de padrões e presença de substâncias interferentes (NACZK e SHAHIDI, 2006).

Vários métodos espectrofotométricos para quantificação de compostos fenólicos em alimentos têm sido desenvolvidos (ANGELO e JORGE, 2007). O método de Folin-Denis é um dos mais utilizados para a determinação de fenólicos totais em vegetais (NACZK e SHAHIDI, 2004). Este método descrito por Swain e Hills (1959) baseia-se na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas, produzindo um complexo de coloração azul que absorve entre 620 e 740 nm com um comprimento de onda máximo em 725 nm. A reação ocorre em meio alcalino e a solução saturada de carbonato de sódio é a base mais indicada. O método de Folin-Denis, no entanto, não é um método específico, pois determina todos os fenólicos presentes, além de substâncias redutoras adicionadas aos alimentos ou naturalmente presentes que podem interferir nos resultados (ANGELO e JORGE, 2007).

Muitas vezes o reagente de Folin-Denis é substituído pelo de Folin-Ciocalteu (SINGLETON e ROSSI, 1965). Este último é mais sensível à redução pelos fenóis e diminui a tendência à precipitação. As principais diferenças entre estes dois reagentes é o uso de sulfato de lítio, a presença de ácido hidrocloreídrico e o longo tempo de aquecimento para a preparação do reagente de Folin-Ciocalteu (ANGELO e JORGE, 2007). Para ambos os testes, o número de grupos hidroxilas ou de grupos potencialmente oxidáveis controla a quantidade de cor formada. O grupo fenólico deve estar na forma de fenolato para os ânions molibdo e tungstofosfato produzirem a oxidação. As moléculas reduzidas são azuis e as não reduzidas são amarelas. Estas últimas se decompõem vagarosamente em pH alcalino, o qual é necessário para a manutenção do fenol na forma de fenolato (SHAHIDI e NACZK, 1995). Este método espectrofotométrico, independente do tipo de reagente utilizado, Folin-Denis ou Folin-Ciocalteu, não é um método específico, pois detecta todos os grupos fenólicos presentes no extrato, incluindo as proteínas extraíveis (NACZK e SHAHIDI, 2004).

A cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são técnicas usadas tanto na separação quanto na quantificação de compostos fenólicos. A elucidação de estruturas tem sido realizada através da combinação de CG e CLAE com a espectrometria de massa, além de outras técnicas relevantes (ANGELO e JORGE, 2007). Para

a separação e quantificação de ácidos fenólicos diferentes técnicas de cromatografia gasosa podem ser empregadas (KRYGIER, SOSULSKI e HOGGE, 1982; DABROWSKI e SOSULSKI, 1984). Inovações na CG como colunas de alta temperatura, controladores de pressão e detectores eletrônicos melhoraram significativamente a resolução e também têm aumentado o alcance de substâncias de alto peso molecular que podem ser analisadas por CG (ANGELO e JORGE, 2007).

Há algumas metodologias descritas para a análise de compostos fenólicos por CG, baseadas nas suas características de polaridade. Os ácidos fenólicos são substâncias que possuem alta polaridade e baixa pressão de vapor. Tais características levaram alguns autores a descrever processos distintos para derivatização e condições de análises cromatográficas, objetivando uma melhor técnica de isolamento e caracterização destes compostos (MOREIRA e MANCINI-FILHO, 2004).

## **1.6 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Existe uma grande diversidade de métodos para medir atividade antioxidante dos alimentos ou das amostras biológicas, seja *in vitro* ou *in vivo* (ANTOLOVICH et al., 2002; TSAO e DENG, 2004). A avaliação da atividade antioxidante nos sistemas alimentares se trata de avaliar a eficiência dos antioxidantes no sentido de proteger os alimentos da oxidação, que está relacionada com a deterioração do alimento, como é o caso de óleos e gorduras, ou com a perda do valor vitamínico. Assim, a medida da atividade antioxidante de alimentos, particularmente frutas, vegetais e bebidas, indica seu potencial como protetores frente à oxidação. No caso da bioatividade, se trata de destacar como os antioxidantes previnem a oxidação de estruturas biológicas (ANTOLOVICH et al., 2002).

Na avaliação da atividade antioxidante, a fonte da espécie reativa de oxigênio (ERO) e do substrato deve ser sempre considerada. Um antioxidante pode proteger os lipídios contra o estresse oxidativo, como pode acelerar o dano de outras moléculas biológicas. Assim, quando se analisa a capacidade antioxidante de uma amostra ou de um protetor, se deve considerar o objetivo do estudo e estabelecer uma série de questões que servem como guia na avaliação da eficácia antioxidante. Não existe um sistema perfeito capaz de medir a atividade antioxidante real de uma amostra dada (MEZADRI, 2005).

O tipo de solvente e a polaridade podem afetar a transferência de elétrons e a transferência de átomos de hidrogênio, que são aspectos chaves na medida da capacidade antioxidante. A presença de compostos não antioxidantes nas soluções testadas também pode afetar os resultados (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO, 2006).

Além disso, o conhecimento do potencial antioxidante em alimentos não indica necessariamente sua capacidade antioxidante *in vivo*. Os efeitos de cooperação que existem entre diferentes antioxidantes (sinergismo), significam que o efeito do conjunto de antioxidantes é maior que a soma da atividade de um antioxidante individual. Por esta razão, os métodos de quantificação são também conhecidos como Atividade Antioxidante Total, que é um parâmetro que quantifica a capacidade de uma amostra (tanto de um produto natural ou artificial) para impedir radicais livres em um meio determinado. Tais métodos consideram a atividade antioxidante como uma característica global do produto em questão, independentemente de sua composição particular (MEZADRI, 2005).

Tanto os métodos *in vitro* como os métodos *in vivo* que têm sido usados na avaliação da atividade antioxidante possuem suas vantagens e limitações. Alguns métodos podem ser utilizados com extratos hidrossolúveis enquanto que outros são mais apropriados para frações lipossolúveis (KAUR e KAPOOR, 2001).

A maioria dos métodos de determinação da atividade antioxidante *in vitro* aplicados atualmente tem como base a formação de radicais livres, os quais são capturados ao ser adicionado o composto antioxidante, ou por inibir a formação de radicais livres, ou então do consumo de oxigênio por esta e/ou a formação de produtos de oxidação. Os radicais livres podem ser gerados por diversos tipos de compostos cromógenos como, por exemplo, o composto azo ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfônico) ou DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazila) (ARENA, FALLICO e MACCARONE, 2001; ANTOLOVICH et al., 2002).

### **1.6.1 Método ABTS**

O radical ABTS<sup>•+</sup> (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfônico) pode ser gerado por enzimas como a peroxidase ou quimicamente, com dióxido de manganês, persulfato de potássio ou ABAP (2,2'-azobis- (2-amidinopropano) HCl) (ARNAO, 2000).

Segundo metodologia desenvolvida por Re et al. (1999) o radical ABTS<sup>•+</sup> pode ser formado por uma reação química com persulfato de potássio que pode chegar a formar mais de 60 % de radicais livres depois de 16 horas de incubação. Os resultados obtidos das análises antioxidantes são equiparados ao Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico 97%), antioxidante sintético, hidrossolúvel e similar à vitamina E, e são expressados em TEAC (quantidades equivalentes a Trolox) (RICE-EVANS, MILLER e PAPAGANDA, 1996).

O ensaio original TEAC pode medir somente antioxidantes hidrossolúveis. Como os alimentos geralmente contêm compostos hidrossolúveis e lipossolúveis, um grande esforço foi realizado para medir também componentes lipossolúveis pela sua solubilização no meio aquoso de reação do ensaio TEAC utilizando solventes adequados. Para a aplicação deste ensaio em alimentos contendo antioxidantes hidro e lipossolúveis a escolha de solventes adequados para a extração e solubilização desses compostos em sistemas aquosos tem sido avaliada (KAUR e KAPOOR, 2001).

### **1.6.2 Método DPPH**

Método de seqüestro de radicais livres desenvolvido por Brand-Willams, Cuvelier e Berset (1995), está baseado na descoloração de uma solução composta de radicais estáveis DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) de cor violeta quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio ou na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante. Os resultados são expressos em TEAC ou mais comumente em IC<sub>50</sub>, ou seja, a quantidade necessária de antioxidante para reduzir em 50 % a absorvância inicial do radical.

### **1.6.3 Método FRAP**

Este teste não é baseado na capacidade de captura de radicais livre, mas sim na habilidade de redução do Ferro. Em meio ácido o complexo férrico tripiridiltriazina é reduzido a sua forma ferrosa de intensa cor azul na presença de antioxidantes, causando um aumento na absorvância a 595 nm. A absorvância final é interpolada em uma curva padrão de Trolox, e os resultados são expressos como TEAC (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO, 2006). No método original, a absorvância foi monitorada até 4 minutos, mas neste tempo a

reação não foi completada, sendo sugerido por Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000) que o monitoramento seja realizado até 30 minutos.

#### **1.6.4 Método da co-oxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoléico**

Avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do  $\beta$ -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico. Determina a atividade de uma amostra ou composto de proteger um substrato lipídico da oxidação (MARCO, 1968; MILLER, 1971; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

### **1.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALONSO, A. M.; GUILLÉN, D. A.; BARROSO, C. G.; PUERTAS, B.; GARCÍA, A. Determination of antioxidant activity of wine by-products and its correlation with polyphenolic content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5832-5836, 2002.

AMICO, V.; NAPOLI, E. M.; RENDA, A.; RUBERTO, G.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C. Constituents of grape pomace from the Sicilian cultivar 'Nerello Mascalese'. **Food Chemistry**, v. 88, n. 4, p. 599-607, 2004.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **The Analyst**, v. 125, p. 989-1009, 2000.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**, v. 127, p. 183-198, 2002.

ARENA, E.; FALLICO, B.; MACCARONE, E. Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. **Food Chemistry**, v. 74, p. 423-427, 2001.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.

ARUOMA, O. I. Nutrition and Health Aspects of Free Radicals and Antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, p. 671-683, 1994.

ARVANITTOYANNIS, I. S.; LADAS, D.; MAVROMATIS, A. Potential uses and applications of treated wine waste: a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 475-487, 2006.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.

BOYCE, M. C. Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweeteners permitted as additives in food by mixed micellar eletrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 847, p. 369-375, 1999.

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

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

CAMPOS, L. Obtenção de extratos de bagaço de uva Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*): Parâmetros de processo e modelagem matemática. Florianópolis, 2005. **Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos** - Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, 2005.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: Structure activity relationships. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, p. 749-760, 1997.



CERUTTI, P. A. Oxy-radicals and cancer. **Lancet**, v. 344, n. 8926, p. 862-863, 1994.

CHEUNG, L. M.; CHEUNG, P. C. K.; OOI, V. E. C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chemistry**, v. 81, p. 249-255, 2003.

CHIDAMBARA-MURTHY, K. N.; JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using *in vivo* models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 17, p. 4791-4795, 2002.

DABROWSKI, J. K.; SOSULSKI, F. W. Quantitation of free and hydrolyzable phenolic acids in seeds by capillary gas-liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 123-127, 1984.

DÁVALOS, A.; GOMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Commercial dietary antioxidant supplements assayed for their antioxidant activity by different methodologies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2512-2519, 2003.

DE LUCA, V.; ST PIERRE, B. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. **Trend Plant Science**, v. 5, p. 168-173, 2000.

DONELLI, J. K.; ROBINSON, D. S. Free radical in foods. **Free Radical Resource**, v. 22, n. 2, p. 147-176, 1995.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

ESABIO – Instituto Biológico de São Paulo. Disponível em: [www.geocities.com/~esabio/interacao/](http://www.geocities.com/~esabio/interacao/). Acessado em: nov. 2007.

ESPÍN, J. C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H. J.; GARCÍA-VIGUERA, C. Anthocyanin-based natural colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1588-1592, 2000.

FORMANEK, Z.; KERRY, J. P.; HIGGINS, F. M.; BUCKLEY, D. J.; MORRISSEY, P. A.; FARKAS, J. Addition of synthetic and natural antioxidants tocopheryl acetate supplemented beef patties: effects of antioxidants and packaging on lipid oxidation. **Meat Science**, v. 58, p. 337-341, 2001.

FRANCIS, F. J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. **Cereal Foods World**, v. 45, p. 208-213, 2000.

GÖKTÜRK BAYDAR, N.; ÖZKAN, G.; ÇETIN, E. S. Characterization of grape seed and pomace oil extracts. **Grasas y aceites**, v. 58, n. 1, p. 29-33, 2007.

GONZALEZ-PARAMAS, A.; ESTEBAN-RUANO, S.; SANTOS-BUELGA, C.; PASCUAL-TERESA, S.; RIVAS-GONZALO, J. Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 234–238, 2004.

HALLIWELL, B. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? **FEBS Letters**, v. 540, p. 3-6, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and Medicine. **Oxford Press**, 3<sup>th</sup> ed., Londres, p. 899, 1999.

HAMID, A. A.; SHAH, Z. M.; MUSE, R.; MOHAMED, S. Characterization of antioxidative activities of various extracts of *Centella asiatica* (L) Urban. **Food Chemistry**, v. 77, p. 465-469, 2002.

HERMES-LIMA, M. Oxidative stress and medical sciences. In: Storey, K. B. **Functional Metabolism. Regulation and adaptation**. Hoboken, New Jersey, p. 370-382, 2004.

HOLLMAN, P. C. H.; ARTS, I. C. W. Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1081-1093, 2000.

KAMMERER, D.; CLAUS, A.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Polyphenol screening of pomace from red and white grapevarieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4360–4367, 2004.

KATSUBE, N.; KEIKO, I.; TSUSHIDA, T.; YAMAKI, K.; KOBORI, M. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 68-75, 2003.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium’s health. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 36, p. 703-725, 2001.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A.; COVAL, S. M.; BINKOSKI, A. E.; HILPERT, K. F.; GRIEL, A. E.; ETHERTON, T. D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 113, p. 71-88, 2002.

KRYGIER, K.; SOSULSKI, F.; HOGGE, L. Free esterified and insoluble bound phenolic acids. Extration and purification procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, p. 334-338, 1982.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; GARCIA-PARILLA, M. C.; FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 691-693, 2004.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept, (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 167-198, 2003.

LEE, S. J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K. G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum*) and thyme leaves (*Thymes vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005.

LOULI, V.; RAGOSSIS, N.; MAGOULAS, K. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 201-208, 2004.

MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Current Opinion Lipidology**, v. 16, n. 1, p. 77-84, 2005.

MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 45, p. 594-598, 1968.

MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. **Food Chemistry**, v. 81, p.189-197, 2003.

MAZZA, G. Anthocyanins in grapes and grape products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, p. 341-371, 1995.

MELLO, L. M. R. Mercado brasileiro de uvas e vinhos. **EMBRAPA/CNPUV**, Bento Gonçalves, Instrução Técnica 001, julho, 2000.

MELLO, L. M. R. Vitivinicultura brasileira: Panorama 2006. **EMBRAPA/CNPUV**, Bento Gonçalves. Artigo técnico disponibilizado em 04/04/07 na página <http://www.cnpuv.embrapa.br/>.

MELLO, L. M. R. Vitivinicultura brasileira: Panorama 2007. **EMBRAPA/CNPUV**, Bento Gonçalves, 2008. Artigo técnico disponibilizado na página <http://www.cnpuv.embrapa.br/>.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-599, 2000.

MEZADRI, T. **Evaluación de la actividad antioxidante de frutos de acerola (*Malpighia emarginata* DC.) y sus derivados**. Sevilla, 2005. 209 p. Tesis de Doctorado – Facultad de Farmacia – Universidad de Sevilla.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 48, p. 91, 1971.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. **Food Chemistry**, v. 60, p. 331-337, 1997.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 411-424, 2004.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1/2, p. 95-111, 2004.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1523-1542, 2006.

NEGRO, C.; TOMMASI, L.; MICELI, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 41–44, 2003.

PARR, A. J.; BOLWELL, G. P. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 985-1012, 2000.

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

PIETTA, P-G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PIMENTEL, C. V. M. L.; FRANCKI, K. M.; BOIAGO, A. P. **Alimentos Funcionais – Introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. 1ª ed., Metha, 95 p., 2005.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v. 67, n. 5, p. 289-297, 1997.

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

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN-CALDENTY, K.-M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 494-507, 2001.

RAMIREZ-TORTOSA, C.; ANDERSEN, O. M.; GARDNER, P. T.; MORRICE, P. C.; WOOD, S. G.; DUTHIE, S. J.; COLLINS, A. R.; DUTHIE, G. G. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin e-depleted rats. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 9, p. 1033-1037, 2001.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

RENAUD, S.; DE LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and french paradox for coronary heart disease. **Lancet**, v. 339, p. 1523-1526, 1992.

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

ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 657-691, 2003.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

ROSIER, J. P.; LOSSO, M. Cadeias produtivas do Estado de Santa Catarina: Vitivinicultura. **EPAGRI, Boletim Técnico**, n. 83, Florianópolis, 41 p., 1997.

SCHIEBER, A.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments. **Trends in Food Science & Technology**, v. 12, n. 11, p. 401-413, 2002.

SEERAM, N. P.; SCHUTZKI, R.; CHANDRA, A.; NAIR, M. G. Characterization, quantification, and bioactivities of anthocyanins in *Cornus* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2519-2523, 2002.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food Phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic, 1995.

SILVA, L. M. L. R. **Caracterização dos Subprodutos da Vinificação**. Revista do ISPV – nº 28. Outubro de 2003. Disponível em: <<http://www.ipv.pt/millennium/Millennium28/10.pdf>> Acesso em: 06 out. 2006.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Sequestering Ability of Butylated Hydroxytoluene, Propyl Gallate, Resveratrol, and Vitamins C and E against ABTS, DPPH, and Hydroxyl Free Radicals in Chemical and Biological Systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 1077-1080, 2003.

SOUQUET, J. M.; LABARBE, B.; LE GUERNEVÉ, C.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Phenolic composition of grape stems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1076-1080, 2000.

SWAIN, T.; HILLS, W. E. The phenolics constituents of *prunus domestica*: the quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 63-68, 1959.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Surface protection and secondary defense compounds. **Plant physiology**, New York, p. 320-345, 1998.

TORRES, J. L.; VARELA, B.; GARCIA, M. T.; CARILLA, J.; MATITO, C.; CENTELLES, J. J.; CASCANTE, M.; SORT, X.; BOBET, R. Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7548-7555, 2002.

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 85-99, 2004.

VINSON, J. A.; JANG, J.; YANG, J.; DABBAGH, Y.; LIANG, X.; SERRY, M.; PROCH, J.; CAI, S. Vitamins and especially flavonoids in common beverages are powerful *in vitro* antioxidants which enrich lower density lipoproteins and increase their oxidative resistance after ex vivo spiking in human plasma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 2502-2504, 1999.

YU, T-W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, v. 379, n. 2, p. 201-210, 1997.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O., et al. (Orgs.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5ª ed., Florianópolis: Ed. Universidade Federal de Santa Catarina, p. 577-614, 2003.



## CAPÍTULO 2

### INFLUÊNCIA DO SOLVENTE NO CONTEÚDO TOTAL DE POLIFENÓIS, ANTOCIANINAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE BAGAÇO DE UVA (*Vitis vinifera* L.) VARIEDADES TANNAT E ANCELOTA

**Artigo aceito para publicação.**

ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera* L.) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. xx, p. xx-xx, 2008.

**INFLUÊNCIA DO SOLVENTE NO CONTEÚDO TOTAL DE POLIFENÓIS,  
ANTOCIANINAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE BAGAÇO  
DE UVA (*Vitis vinifera* L.) VARIEDADES TANNAT E ANCELOTA**

Ismael Ivan ROCKENBACH<sup>1\*</sup>, Graciela Lessa da SILVA<sup>1</sup>, Eliseu RODRIGUES<sup>1</sup>, Eugênia  
Marta KUSKOSKI<sup>1</sup>, Roseane FETT<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Rod. Admar Gonzaga 1346, Itacorubi, Florianópolis, Brasil. CEP: 88034-001.

\* A quem a correspondência deve ser enviada  
e-mail: ismael.rockenbach@gmail.com

## **RESUMO**

Diferentes sistemas solventes foram aplicados para determinar a eficiência de extração de compostos com capacidade antioxidante em bagaço de uva, importante subproduto do processo de vinificação. Realizou-se a quantificação de compostos fenólicos totais, antocianinas totais e atividade antioxidante nos extratos de bagaço de uva *Vitis vinifera* L. das variedades *Tannat* e *Ancelota*, provenientes da região de Videira, Santa Catarina. A atividade antioxidante foi determinada pelos métodos ABTS, FRAP e  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. Conteúdos de compostos fenólicos totais em acetona 50 e 70 % foram maiores nas duas variedades, enquanto que os conteúdos de antocianinas totais extraídos em ambas as variedades foram maiores no solvente etanol em concentrações de 50 e 70 %. Pelo método ABTS a atividade antioxidante foi maior nas concentrações de 50 e 70 % de acetona para a variedade *Tannat* e 50 e 70 % de acetona e etanol para a variedade *Ancelota*. Em relação ao poder redutor pelo método FRAP, este foi maior em solvente acetona 70 % para as duas variedades. No ensaio do poder de inibição da oxidação a adição de 100 e 200  $\mu$ L de extratos etanólicos a 50 % das variedades *Tannat* e *Ancelota* apresentou maior eficiência, sendo quase duas vezes superior aos extratos acetônicos testados.

**Palavras-chave:** subprodutos, extração, oxidação, poder redutor.

## **ABSTRACT**

Different solvent systems were applied in order to determine the extraction efficiency of compounds with antioxidant capacity from grape pomace, an important by-product of wine

production. Quantification of total phenolics, anthocyanins and antioxidant activity were carried out in grape pomace extracts of Tannat and Ancelota varieties from Videira region, Santa Catarina. Antioxidant activity was determined by ABTS, FRAP and  $\beta$ -carotene/linoleic acid system methods. Extracts from acidified aqueous solutions of acetone and ethanol in different concentrations (v.v<sup>-1</sup>) showed higher yield in aqueous solutions of acetone 50 % and 70 % for Tannat variety and acetone/ethanol 50 % for Ancelota variety. Total phenolic contents in acetone 50 % and 70 % were higher in both varieties, while anthocyanin contents from these varieties were higher in ethanol 50 % and 70 %. Antioxidant activity was higher in acetone 50 % and 70 % for Tannat variety and acetone/ethanol 50 % and 70 % for Ancelota variety by ABTS method. Regarding to reduction power, performed by FRAP method, it was higher in acetone 70 % for both varieties. In oxidation inhibition power assay, addition of 100  $\mu$ L and 200  $\mu$ L of ethanolic extracts 50 % of Tannat and Ancelota varieties showed higher efficiency, being almost two times higher than acetonic extracts.

**Keywords:** byproducts, extraction, oxidation, reduction power.

## 1 INTRODUÇÃO

É de conhecimento científico o potencial antioxidante dos compostos fenólicos, atuando como redutores de oxigênio singlete, nas reações de oxidação lipídica e na quelação de metais. Apresentam uma ampla gama de propriedades farmacológicas, como anti-alérgicas, anti-arteriogênicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, anti-trombóticas e também efeitos cardio-protetores e vasodilatadores (PUUPPONEN-PIMIÄ et al, 2001; MANACH, MAZUR e SCALBERT, 2005).

A uva é fonte de diversos compostos fenólicos em elevadas concentrações e os subprodutos da vinificação, em sua maioria, podem manter quantidades apreciáveis, principalmente de fenólicos, que pertencem ao grupo dos flavonóides. Os glicosídeos de flavonóis e as antocianinas estão entre os compostos fenólicos mais determinados e estudados nas uvas, por sua destacada atividade antioxidante e por suas propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas (NEGRO, TOMMASI e MICELI, 2003; AMICO et al, 2004; SILVA, MATIAS e NUNES, 2005).

O processo de fabricação do vinho gera uma quantidade estimada de resíduo sólido de 20% do peso inicial (GÓMEZ-PLAZA, MIÑANO e LÓPEZ-ROCA, 2006). Alguns estudos a respeito dos subprodutos da vinificação focalizam principalmente a composição de polifenóis das sementes, que são muito ricas em flavonóis (YILMAZ e TOLEDO, 2004; GUENDEZ et al, 2005b). As sementes representam em torno de 15% do resíduo sólido produzido e contêm

de 14 a 17% de óleo, o que depende da variedade da uva (GÖKTÜRK BAYDAR e AKKURT, 2001; LUQUE-RODRÍGUEZ, LUQUE DE CASTRO e PÉREZ-JUAN, 2005).

Outros estudos focalizam o potencial antioxidante do bagaço em sua totalidade, composto de sementes e das cascas (ALONSO et al, 2002; LOULI, RAGOSSIS e MAGOULAS, 2004; KAMMERER et al, 2005; PINELO et al, 2005). Outras partes do conjunto da uva são rejeitadas durante o processo de vinificação, como os engaços, e recebem muito menos atenção, embora contenham uma quantidade importante de polifenóis (SOUQUET et al, 2000).

A recuperação de compostos antioxidantes dos desperdícios contínuos da indústria de vinho poderia representar um avanço significativo na manutenção do equilíbrio do meio ambiente, visto que nas vinícolas as grandes quantidades de resíduos gerados apresentam sérios problemas de armazenagem, de transformação, ou de eliminação, em termos ecológicos e econômicos. Esta situação explica o interesse crescente em explorar os subprodutos da vinificação (ALONSO et al, 2002).

Diversos métodos e sistemas de solventes vêm sendo usados para a extração de polifenóis de matérias vegetais (CHAVAN, SHAHIDI e NACZK, 2001) visando determinar a capacidade antioxidante (GOLI, BARZEGA e SAHARI, 2004; PRIOR, WU e SCHAICH, 2005). O tipo de solvente e a polaridade podem afetar a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio, que são aspectos chaves na medida da capacidade antioxidante. A presença de compostos não antioxidantes nas soluções testadas também pode afetar os resultados (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO, 2006). O rendimento da extração depende tanto do solvente utilizado (OU, HAMPSCH-WOODILL e PRIOR, 2001; GRAY et al, 2002; YU et al, 2002; SUN e HO, 2005; YILMAZ e TOLEDO, 2006) como do método aplicado, que pode ser baseado em mecanismos químicos diferentes. Além do rendimento há grande variação na composição do extrato em função do sistema solvente utilizado (MOURE et al, 2001).

O objetivo deste estudo foi avaliar o conteúdo total de fenólicos, antocianinas e a capacidade antioxidante do extrato de bagaço de uva (*Vitis vinifera* L.) de duas variedades, *Tannat* e *Ancelota*, utilizando diferentes sistemas solventes.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Amostras**

Foram utilizadas amostras de bagaço das uvas tintas *Vitis vinifera* L., var. *Tannat* e *Ancelota*, coletadas na região de Videira, Santa Catarina. As amostras são resultantes da safra de 2005/2006, sendo cedidas pela EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão

Rural de Santa Catarina) de Videira, Santa Catarina. Tendo por objetivo preservar as propriedades gerais dos bagaços, os exemplares foram acondicionados em caixas isotérmicas contendo gelo e encaminhadas imediatamente ao laboratório, onde foram armazenados à temperatura de  $-18,0 \pm 0,2$  °C e posteriormente analisadas.

## **2.2 Métodos**

### **2.2.1 Preparação dos extratos**

As amostras de bagaço de uva das variedades *Tannat* e *Ancelota* foram submetidas a tratamento térmico em estufa de ar circulante a 80 °C, num período de 10 min, para inativação enzimática (VALDERRAMA, MARANFONI e CLEMENTE, 2001; TROIANI, TROPIANI e CLEMENTE, 2003). Posteriormente foram secas em estufa de ar circulante, a temperatura de 50 °C por 24 horas. Após resfriamento em dessecador, as amostras foram trituradas (60 mesh) e desengorduradas em extrator Soxhlet, utilizando solvente hexano, durante 6 horas a 60 °C. O resíduo do bagaço foi submetido à extração com diferentes sistemas solventes. Os extratos foram preparados com 2,5 g de material seco desengordurado, utilizando como solventes extratores soluções etanol/água e acetona/água a 0, 30, 50, 70 e 100 % (v.v<sup>-1</sup>), acidificados com HCl a 0,1 %. A extração (3 x 25 mL) foi procedida sob agitação mecânica e ao abrigo da luz no intervalo de 2 horas, sendo posteriormente filtrados em papel filtro Whatman nº 1 e transferidos para balão volumétrico com volume final ajustado para 50 mL.

### **2.2.2 Determinação de fenólicos totais**

O conteúdo total de polifenóis em cada extrato foi determinado espectrofotometricamente de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (ROSSI e SINGLETON, 1965) com a leitura da absorbância em 765 nm, e os resultados expressos em gramas de equivalente a ácido gálico (GAE) por 100 gramas de bagaço seco. Uma alíquota de 0,1 mL da amostra diluída foi misturada com 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 1,5 mL de carbonato de sódio 20 % em balão volumétrico de 10 mL, completando o volume com água destilada. A concentração do conteúdo de fenólicos totais foi medida após 2 horas de repouso da mistura e seu valor comparado com o do padrão de ácido gálico.

### **2.2.3 Determinação do conteúdo total de antocianinas**

A análise do conteúdo total de antocianinas foi realizada seguindo-se o método de diferença de pH (GIUSTI e WROLSTAD, 2001). Os extratos foram diluídos para que a amostra atingisse uma absorbância entre 0,100 e 1,200 no comprimento de onda de 520 nm.

Para uma alíquota de 0,2 mL de amostra diluída foram adicionados 1,8 mL da solução de cloreto de potássio (pH 1) em tubos de ensaio, homogeneizado e armazenado por 10 minutos em ausência de luz, sendo realizado procedimento equivalente com solução de acetato de sódio (pH 4,5). A absorbância foi medida no comprimento de onda máximo e em 700 nm, e o branco feito com água destilada. Os resultados foram expressos como concentração de pigmentos monoméricos ( $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) e expressos em equivalente a malvidina-3-glicosídeo ( $\epsilon = 29500$ ,  $\text{PM} = 562,5$ ).

#### **2.2.4 Determinação da capacidade antioxidante – Método ABTS<sup>•+</sup>**

Para determinar a atividade antioxidante utilizou-se o método descrito por RE et al (1999). O radical ABTS<sup>•+</sup> foi formado pela reação de 2,45 mM de persulfato de potássio com 7 mM de 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico), armazenado no escuro, à temperatura ambiente, durante por 16 horas. Uma vez formado, o radical ABTS<sup>•+</sup> foi diluído em etanol até obter-se uma medida de absorbância de 0,70 ( $\pm 0,02$ ) em comprimento de onda de 754 nm, a uma temperatura de equilíbrio de 30 °C (KUSKOSKI et al, 2004). A absorbância foi medida em espectrofotômetro modelo Hewlett-Packard 8425A, no tempo de 7 minutos após a adição da amostra 0,70 ( $\pm 0,02$ ) no comprimento de onda de 754 nm. A capacidade antioxidante total da amostra foi calculada em relação à atividade do antioxidante sintético Trolox, nas mesmas condições, e os resultados foram expressos em  $\mu\text{Mol TEAC}\cdot\text{g}^{-1}$  (atividade antioxidante equivalente ao Trolox) (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1996).

#### **2.2.5 Determinação do poder redutor - Método FRAP**

Utilizou-se o método descrito por BENZIE e STRAIN (1996), com modificações de ARNOUS, MAKRIS e KEFALAS (2002). Este se baseia na medida direta da habilidade dos antioxidantes (redutores) da amostra em reduzirem, em meio ácido (pH 3,6), o complexo  $\text{Fe}^{3+}$  /tripiridiltriazina (TPTZ), para formar  $\text{Fe}^{2+}$ , de intensa cor azul e absorção máxima a 593 nm. As amostras de extrato do bagaço de uva foram diluídas em água destilada, acrescentados a 0,1 mL da amostra um volume de 0,1 mL de cloreto férrico 3 mM (em ácido cítrico 5 mM). A mistura foi mantida em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Após este tempo, adicionou-se 1,8 mL de solução TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina) 1 mM em HCl 0,05 M. Transcorridos 10 minutos a absorbância foi medida em comprimento de onda de 620 nm. O valor de  $P_R$  foi

calculado de acordo com a curva de calibração previamente preparada, sendo os resultados expressos em  $\mu\text{Mol TEAC.g}^{-1}$  (atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

### **2.2.6 Determinação da capacidade antioxidante - Sistema de co-oxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoléico**

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada em meio emulsionado, através da técnica de co-oxidação de substratos, segundo MARCO (1968) e modificada por MILLER (1971). O método colorimétrico é realizado em comprimento de onda de 470 nm e baseia-se na leitura referente à descoloração da solução preparada de  $\beta$ -caroteno e ácido linoléico, em meio aquoso.

Uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  da solução de  $\beta$ -caroteno (20  $\text{mg.mL}^{-1}$  em clorofórmio) foi colocada em um frasco erlenmeyer de 250 mL com 40  $\mu\text{L}$  de ácido linoléico, 1 mL de clorofórmio e 20 mg de Tween 40. O clorofórmio foi completamente evaporado com nitrogênio. Ao erlenmeyer foram adicionados 150 mL de água deionizada (previamente submetida a tratamento com atmosfera de oxigênio, durante 30 minutos). A emulsão apresentou-se límpida e sua absorvância foi ajustada entre 0,7 a 0,6 nm a 470 nm. Diferentes alíquotas dos extratos a 100 ppm (50, 100 e 200  $\mu\text{L}$ ) foram comparadas ao controle (sem antioxidante) e ao BHT (butil hidroxitolueno), utilizado como antioxidante padrão. Além disso, o efeito sinérgico foi avaliado utilizando misturas das amostras com BHT nas mesmas concentrações do extrato puro. Uma leitura inicial da absorvância foi feita imediatamente após a adição das amostras e do padrão ao sistema visando a determinação do tempo zero. Posteriormente, a absorvância foi monitorada a cada 15 min, durante o período de 2 h. As cubetas foram mantidas em banho-maria a 50 °C durante as leituras.

A capacidade antioxidante foi calculada em termos de percentual de inibição.

### **2.3 Análise Estatística**

A análise dos dados foi realizada pela aplicação da ANOVA e o teste Tukey visando identificar diferenças significativas entre as médias, usando o software Statistica<sup>®</sup> 6.0. O nível de significância considerado para a diferença entre as médias foi de 5 % ( $P < 0,05$ ). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### 3.1 Compostos fenólicos totais

Os conteúdos de fenólicos totais extraídos com acetona e etanol nas diferentes concentrações estão indicados na **Tabela 1**. Os valores obtidos na extração com os sistemas solventes acetona 50 e 70 % (v.v<sup>-1</sup>) apresentaram maior conteúdo fenólico para as duas variedades de uva analisadas: 7,95 e 7,56 g GAE.100g<sup>-1</sup> em peso seco para variedade *Anceleta* e 6,59 e 6,90 g GAE.100g<sup>-1</sup> em peso seco para a variedade *Tannat*. Assim, as características físico-químicas destes sistemas solventes assemelham-se em maior grau às características da maioria dos compostos fenólicos presentes nas amostras avaliadas. Não houve diferença significativa entre as concentrações de 50 e 70 % (v.v<sup>-1</sup>) em cada variedade estudada ( $P < 0,05$ ). Esses resultados estão de acordo com o estudo feito por YILMAZ e TOLEDO (2006), que relataram que misturas aquosas de acetona a 50 e 75 % (v.v<sup>-1</sup>) foram mais eficientes na extração de constituintes fenólicos em semente de uva que os sistemas etanol 60 % e metanol 70 % (v.v<sup>-1</sup>).

**Tabela 1.** Compostos fenólicos totais de extratos de bagaço de uva\* (g GAE.100g<sup>-1</sup> peso seco).

Solventes usados na extração	Anceleta	Tannat
Água	1,48 ± 0,03 a	1,50 ± 0,13 a
Etanol 30 %	5,41 ± 0,02 c,d	3,96 ± 0,22 b
Etanol 50 %	7,32 ± 0,31 e	5,84 ± 0,14 c
Etanol 70 %	5,86 ± 0,12 d	5,59 ± 0,06 c
Etanol 100 %	2,73 ± 0,02 b	3,73 ± 0,02 b
Acetona 30 %	5,22 ± 0,10 c	3,63 ± 0,04 b
Acetona 50 %	7,95 ± 0,25 f	6,59 ± 0,12 d
Acetona 70 %	7,56 ± 0,06 e,f	6,90 ± 0,04 d
Acetona 100 %	1,82 ± 0,23 a	1,32 ± 0,16 a

\*Valores expressos como média ± desvio padrão.

Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística entre si (Tukey HSD,  $P < 0,05$ ).

Em uma recente pesquisa desenvolvida por LLOBERA e CAÑELLAS (2007), com o bagaço de uvas tintas variedade “Manto Negro” (*Vitis vinifera* L.), os teores médios de compostos fenólicos extraídos sequencialmente com metanol a 50 % e acetona a 70 % (v.v<sup>-1</sup>) oscilaram entre 2,63 a 11,6 g GAE.100g<sup>-1</sup> em peso seco. NEGRO, TOMMASI e MICELI (2003), estudando os resíduos da vinificação de uva da variedade “Negro amaro” na extração



com etanol a 80 % (v.v<sup>-1</sup>) acidificado, encontraram conteúdos de compostos fenólicos de 3,33, 8,58 e 4,19 g GAE.100g<sup>-1</sup> em peso seco na casca, semente e bagaço, respectivamente. GÖKTÜRK BAYDAR, ÖZKAN e SAGDIÇ (2004), também estudando sementes e bagaço de uva obtiveram 4,54 g GAE.100g<sup>-1</sup> em peso seco de compostos fenólicos totais em bagaço de uva utilizando acetato de etila:metanol:água (60:30:10) como sistema solvente e 2,95 g GAE.100g<sup>-1</sup> com sistema solvente etanol a 95 % (v.v<sup>-1</sup>).

Diversos autores concluíram que não é uma tarefa fácil encontrar um método único que é adequado para a análise de um grupo diverso de fenólicos devido à diversidade das estruturas químicas e variação de sensibilidade dos compostos às condições de extração (ANTOLOVICH et al, 2000). Os teores de compostos fenólicos presentes no bagaço de uva representam uma grande variedade de compostos, incluindo os flavonóides. Entre estes, destacando-se as antocianinas (ORAK, 2007). KAMMERER et al (2004) caracterizaram os compostos fenólicos de 14 diferentes amostras de bagaço de uva utilizando metanol acidificado como solvente extrator, sendo identificados 13 tipos de antocianinas, 11 ácidos fenólicos, 13 catequinas e flavonóis e 2 estilbenos.

### 3.2 Antocianinas Totais

As antocianinas estão localizadas nas células próximas à superfície das plantas e são facilmente extraídas de materiais vegetais por solventes orgânicos. Tradicionalmente, soluções acidificadas de metanol, etanol, acetona, água e misturas de acetona/metanol/água têm sido usadas para a extração de antocianinas (JU e HOWARD, 2003).

**Tabela 2.** Antocianinas totais de extratos de bagaço de uva\* (g.100g<sup>-1</sup> peso seco)<sup>1</sup>.

Solventes usados na extração	Anceleta	Tannat
Água	0,13 ± 0,02 a	0,04 ± 0,00 a,b
Etanol 30 %	1,30 ± 0,04 e	0,50 ± 0,03 d
Etanol 50 %	1,95 ± 0,02 f	0,77 ± 0,02 e
Etanol 70 %	1,93 ± 0,06 f	0,77 ± 0,03 e
Etanol 100 %	0,42 ± 0,00 c	0,14 ± 0,03 b,c
Acetona 30 %	0,83 ± 0,07 d	0,19 ± 0,00 c
Acetona 50 %	0,50 ± 0,03 c	0,37 ± 0,01 d
Acetona 70 %	0,30 ± 0,00 b	0,22 ± 0,04 c
Acetona 100 %	nd	nd

\*Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística entre si (Tukey HSD,  $P < 0,05$ ).

nd = não detectado

<sup>1</sup>Equivalente a malvidina-3-glicosídeo.

Em nosso estudo utilizando acetona e etanol como sistemas solventes, os extratos do bagaço da uva apresentaram concentrações de antocianinas mais elevadas em meio hidroalcoólico:  $1,93 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  em peso seco na concentração de 70 % e  $1,95 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  em peso seco na concentração de 50 % para a variedade *Anceleta*; e  $0,77 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  nas concentrações de 70 e 50 % para a variedade *Tannat* (**Tabela 2**). Não houve diferença significativa entre as concentrações de 50 e 70 % (v.v<sup>-1</sup>) em cada variedade estudada ( $P < 0,05$ ). Esses teores foram mais de duas vezes superiores aos teores obtidos com o sistema solvente acetona para as duas variedades avaliadas. Esta maior eficiência na extração justifica a utilização, em diversos trabalhos, dos solventes hidroalcoólicos metanol e etanol em meio acidificado para a extração de antocianinas de resíduos do processo de vinificação.

Concentrações similares às encontradas em nosso estudo foram obtidas em recente trabalho publicado pelos pesquisadores RUBERTO et al (2007), que relataram extrair do bagaço de diferentes cultivares de uva, usando solvente metanol acidificado, valores médios de antocianinas totais na faixa de 0,38 a  $2,9 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  em peso seco. NEGRO, TOMMASI e MICELI (2003) encontraram conteúdos de antocianinas totais de 0,98 g (equivalente a malvidina). $100\text{g}^{-1}$  em peso seco.

Entre outras funções, as antocianinas são contribuintes para as propriedades antioxidantes de alimentos (EINBOND et al, 2004). Segundo GÓMEZ-PLAZA, MIÑANO e LÓPEZ-ROCA (2006), água e solventes hidroalcoólicos são preferidos quando o objetivo é obter corantes ou produtos antioxidantes para a indústria de alimentos.

### 3.3 Atividade Antioxidante e Poder Redutor

A atividade antioxidante e o poder redutor para os extratos da variedade *Anceleta* e *Tannat* são apresentados na **Tabela 3**. A variação da atividade antioxidante foi expressiva em relação às concentrações de solventes utilizadas no experimento. Níveis de atividade antioxidante mais elevados para a variedade *Tannat* são observados nos extratos obtidos com solvente acetona nas concentrações de 50 e 70 % (v.v<sup>-1</sup>), de 466,4 e  $476,2 \mu\text{Mol TEAC} \cdot \text{g}^{-1}$  respectivamente, sem diferença significativa entre si ( $P < 0,05$ ). Para a variedade *Anceleta* os maiores valores de atividade antioxidante foram obtidos com solvente nas concentrações de

50 e 70 % (v.v<sup>-1</sup>), de 400,7 e 389,9  $\mu\text{Mol TEAC.g}^{-1}$  para etanol e 403,4 e 393,9  $\mu\text{Mol TEAC.g}^{-1}$  para acetona, respectivamente, sem diferença significativa entre todos esses tratamentos ( $P < 0,05$ ).

A atividade antioxidante pode depender de vários fatores, incluindo as propriedades coloidais dos substratos, as condições e etapas de oxidação, a formação e estabilidade dos radicais, assim como a possível localização dos antioxidantes e estabilidade em distintas fases do processamento nos alimentos. Como descrevem PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO (2006), as diferenças observadas na atividade antioxidante quando são utilizados diferentes solventes extratores podem ser maiores se a amostra analisada for um alimento, visto que a mesma representa uma matriz complexa de diferentes componentes, que podem estabelecer entre si e com os solventes inúmeras e diferentes interações. Esses autores encontraram diferenças significativas na atividade antioxidante pelo método ABTS, influenciadas pela polaridade e pelo pH do solvente, com valores maiores em solventes mais polares e pHs maiores. Utilizando-se o método ABTS em nosso estudo, o coeficiente de regressão  $r^2$  entre o conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante foi de 0,9199 e 0,9817 para as variedades *Ancelota* e *Tannat*, respectivamente. Esses valores confirmam os dados apresentados por diversos estudos, mostrando que a capacidade antioxidante é dependente do teor de compostos fenólicos presentes (ALONSO et al, 2002; GUENDEZ et al, 2005a; GÓMEZ-PLAZA, MIÑANO e LÓPEZ-ROCA, 2006; THAIPONG et al, 2006; MAKRIS, BOSKOU e ANDRIKOPOULOS, 2007).

**Tabela 3.** Atividade antioxidante e Poder Redutor ( $\mu\text{Mol.g}^{-1}$ ) em peso seco de extratos de bagaço de uva\*.

Amostras	<i>Ancelota</i>		<i>Tannat</i>	
	ABTS (TEAC)	FRAP (TEAC)	ABTS (TEAC)	FRAP (TEAC)
Água	66,1 $\pm$ 0,9 b	218,7 $\pm$ 1,2 b	37,1 $\pm$ 1,0 a	201,7 $\pm$ 2,3 a
Etanol 30 %	293,5 $\pm$ 0,1 d	515,1 $\pm$ 2,3 d	234,3 $\pm$ 1,5 b	384,1 $\pm$ 5,5 b
Etanol 50 %	400,7 $\pm$ 4,2 f	686,4 $\pm$ 3,7 f	341,5 $\pm$ 3,5 c	531,7 $\pm$ 3,7 c
Etanol 70 %	389,9 $\pm$ 3,8 f	671,1 $\pm$ 5,7 f	398,1 $\pm$ 2,8 d	592,4 $\pm$ 6,3 d
Etanol 100 %	158,8 $\pm$ 2,3 c	334,1 $\pm$ 4,7 c	226,2 $\pm$ 2,6 b	395,1 $\pm$ 5,7 b
Acetona 30 %	338,2 $\pm$ 1,8 e	565,7 $\pm$ 4,3 e	223,1 $\pm$ 3,8 b	381,1 $\pm$ 2,3 b
Acetona 50 %	403,4 $\pm$ 3,4 f	710,1 $\pm$ 6,7 g	466,4 $\pm$ 2,2 e	647,7 $\pm$ 6,3 e
Acetona 70 %	393,9 $\pm$ 0,8 f	746,7 $\pm$ 1,3 h	476,2 $\pm$ 3,9 e	684,7 $\pm$ 4,7 f
Acetona 100 %	17,2 $\pm$ 0,4 a	164,4 $\pm$ 1,7 a	48,2 $\pm$ 1,3 a	204,1 $\pm$ 1,7 a

\*Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística entre si (Tukey HSD,  $P < 0,05$ ).

Em estudo realizado por PASTRANA-BONILLA et al (2003) foram encontrados valores semelhantes aos de nosso estudo para a atividade antioxidante média, sendo de 326,3  $\mu\text{Mol TEAC.g}^{-1}$  em peso fresco para extratos metanólicos (80 % em 6 N HCl) de sementes de uva de diferentes variedades, pelo método ABTS (leitura em 6 minutos).

Os maiores valores de poder redutor obtidos pelo método FRAP foram de 746,7 e 684,7  $\mu\text{Mol TEAC.g}^{-1}$  em solvente acetona a 70 % (v.v<sup>-1</sup>) para as variedades *Anceleta* e *Tannat*, respectivamente. No estudo realizado por PULIDO, BRAVO e SAURA-CALIXTO (2000) observou-se que a utilização de diferentes solventes influencia o poder redutor da amostra a ser analisada. Segundo esses autores, a eficiência antioxidante determinada pelo método FRAP depende do potencial redox dos compostos analisados, caracterizado pela complexidade de suas moléculas. O coeficiente de regressão  $r^2$  entre o conteúdo de fenólicos totais e poder redutor foi de 0,951 e 0,9805 para *Anceleta* e *Tannat*, respectivamente, indicando a significativa relação entre esses parâmetros.

Em estudo realizado por SHUI e LEONG (2006) o valor de FRAP encontrado em resíduo de carambola foi de 510,3  $\mu\text{Mol.g}^{-1}$  em peso seco. No estudo de GUO et al (2003) com diversos tipos de frutas, o poder redutor de uva tinta foi equivalente a 670,5  $\mu\text{Mol.g}^{-1}$  em peso fresco.

### 3.4 Poder de inibição da oxidação

Os extratos de bagaço de uva das variedades *Anceleta* e *Tannat* de concentração 50 % (v.v<sup>-1</sup>) também foram testados pelo ensaio da inibição da oxidação de substratos  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico (**Tabela 4**). Os extratos etanólicos apresentaram melhor percentual de inibição da oxidação, com 55,77 e 53,29 % na adição de 200  $\mu\text{L}$  dos extratos das variedades *Tannat* e *Anceleta*, respectivamente. Na seqüência, a adição de 100  $\mu\text{L}$  dos extratos etanólicos apresentou 40,35 e 42,98 % de inibição da oxidação, também para *Tannat* e *Anceleta*, respectivamente. Os extratos obtidos com acetona apresentaram poder de inibição da oxidação menor, aproximadamente metade do percentual obtido com adição de 200  $\mu\text{L}$  dos extratos etanólicos. Esses valores foram de 24,29 e 29,62 % para *Tannat* e *Anceleta* respectivamente, na adição de 200  $\mu\text{L}$ . Isto demonstra que para os extratos analisados o sistema solvente extrator influenciou a composição de substâncias com capacidade

antioxidante presentes. JAYAPRAKASHA, SINGH e SAKARIAH (2001), utilizando diferentes sistemas solventes em extratos de semente de uva, obtiveram 89,3 % de inibição com acetato de etila em meio aquoso (proporção 17:3). NEGRO, TOMMASI e MICELI (2003) relataram 73,50 % de inibição da oxidação na utilização de 200  $\mu$ L de extrato de bagaço de uva de concentração fenólica de 80 ppm.

**Tabela 4.** Percentual de inibição da oxidação pelo sistema de co-oxidação de substratos  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico\*.

Extratos	Extrato			BHT			BHT + Extrato		
	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L	25/25	50/50	100/100
EtT	13,17 $\pm$ 1,54	40,35 $\pm$ 0,12	55,77 $\pm$ 0,80	83,17 $\pm$ 1,74	89,33 $\pm$ 2,38	94,88 $\pm$ 0,87	72,10 $\pm$ 0,59	82,92 $\pm$ 2,44	91,89 $\pm$ 1,18
AcT	13,22 $\pm$ 1,18	23,68 $\pm$ 3,61	24,29 $\pm$ 2,25	85,41 $\pm$ 0,69	95,52 $\pm$ 1,70	99,00 $\pm$ 1,47	62,62 $\pm$ 6,32	84,94 $\pm$ 1,41	91,28 $\pm$ 1,05
EtA	7,63 $\pm$ 2,02	42,98 $\pm$ 5,06	53,29 $\pm$ 2,39	81,51 $\pm$ 1,30	88,93 $\pm$ 1,32	97,93 $\pm$ 2,60	62,12 $\pm$ 0,32	82,81 $\pm$ 2,11	89,65 $\pm$ 0,93
AcA	6,11 $\pm$ 2,16	15,49 $\pm$ 1,86	29,62 $\pm$ 3,42	84,99 $\pm$ 0,45	91,35 $\pm$ 0,58	92,95 $\pm$ 1,95	66,02 $\pm$ 0,96	79,88 $\pm$ 2,41	89,25 $\pm$ 0,54

EtT = extrato etanólico *Tannat*; EtA = extrato etanólico *Anceleta*; AcT = extrato acetônico *Tannat*; AcA = extrato acetônico *Anceleta*.

\*Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

O BHT apresentou maior eficiência em comparação com os extratos analisados. Observa-se que a mistura de BHT e extrato produziu efeito sinérgico, mantendo os percentuais de inibição semelhantes aos obtidos com o antioxidante sintético aplicado isoladamente, uma vez que a inibição obtida pelos extratos foi menos expressiva.

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram que o sistema solvente utilizado na extração de bagaço de uva influencia diretamente os conteúdos de fenólicos totais, antocianinas e atividade antioxidante dos extratos. Compostos fenólicos totais foram melhor extraídos em solvente acetona (50 e 70 %), enquanto que as antocianinas foram melhor extraídas em solvente etanol (50 e 70 %).

Para obtenção de dados ainda mais conclusivos devem ser realizados trabalhos posteriores com outros cultivares difundidos no setor vitivinícola brasileiro e outros solventes indicados na literatura.

#### REFERÊNCIAS

ALONSO, A. M.; GUILLÉN, D. A.; BARROSO, C. G.; PUERTAS, B.; GARCÍA, A. Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 5832-5836, 2002.

AMICO, V.; NAPOLI, E. M.; RENDA, A.; RUBERTO, G.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C. Constituents of grape pomace from the Sicilian cultivar 'Nerello Mascalese'. **Food Chemistry**, v. 88, p. 599-607, 2004.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. Critical Review. **Analyst**, v. 125, p. 989-1009, 2000.

ARNOUS, A.; MAKRIS, D.; KEFALAS, P. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. **J. Food Comp. Anal.**, v. 15, p. 655-665, 2002.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

CHAVAN, U. D.; SHAHIDI, F.; NACZK, M. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus L.*) as affected by different solvents. **Food Chemistry**, v. 75, p. 509-512, 2001.

DUMON, M. C. **Recherches analytiques sur les picnogenols**. France, 1990, These pour le Doctorat d'Etat des Sciences pharmaceutique, Universite de Bordeaux II.

EINBOND, L.; REYNERTSON, K.; LUO, X.; BASILE, M.; KENNELLY, E. Anthocyanin antioxidant from edible fruits. **Food Chemistry**, n. 84, p. 23-28, 2004.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins. Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. In: Wrolstad, R. E. (Ed.) *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: John Wiley & Sons, 2001. Unit. F1.2.1-13.

GÖKTÜRK BAYDAR, N.; AKKURT, M. Oil content and oil quality properties of some grape seeds. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 25, p. 163-168, 2001.

GÖKTÜRK BAYDAR, N.; ÖZKAN, G.; SAGDIÇ, O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. **Food Control**, v. 15, p. 335-339, 2004.

GOLI, A. H.; BARZEGAR, M.; SAHARI, M. A. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. **Food Chemistry**, v. 92, p. 521-525, 2004.

GÓMEZ-PLAZA, E.; MIÑANO, A.; LÓPEZ-ROCA, J. M. Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. **Food Chemistry**, v. 97, p. 87-94, 2006.

GRAY, D. A.; CLARKE, M. J.; BAUX, C.; BUNTING, J. P.; SALTER, A. M. Antioxidant activity of oat extracts added to human LDL particles and in free radical trapping assays. **Journal of Cereal Science**, v. 36, p. 209-218, 2002.

GUENDEZ, R.; KALLITHRAKA, S.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. An analytical survey of the polyphenols of seeds of varieties of grape (*Vitis vinifera* sp.) cultivated in Greece: implications for exploitation as a source of value-added phytochemicals. **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 17-23, 2005.

GUENDEZ, R.; KALLITHRAKA, S.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity. **Food Chemistry**, v. 89, p. 1-9, 2005.

GUO, C.; YANG, J.; WEI, J.; LI, Y.; XU, J.; JIANG, Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. **Nutrition Research**, v. 23, p. 1719-1726, 2003.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. **Food Chemistry**, v. 73, p. 285-290, 2001.

JU, Z. Y.; HOWARD, L. R. Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics from Dried Red Grape Skin. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 5207-5213, 2003.

KAMMERER, D.; CLAUS, A.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 4360-4367, 2004.

KAMMERER, D.; CLAUS, A.; SCHIEBER, A.; CARLE, A. A novel process for the recovery of polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace, **J. Food Sci.**, v. 70, p. 157-163, 2005.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; GARCÍA-PARILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M.; FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 4, p. 691-693, 2004.

LLOBERA, A.; CAÑELLAS, J. Dietary fibre content and antioxidant activity of Mano Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. **Food Chemistry**, v. 101, p. 659-666, 2007.

LOULI, V.; RAGOSSIS, N.; MAGOULAS, K. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 201-208, 2004.

LUQUE-RODRÍGUEZ, J. M.; LUQUE DE CASTRO, M. D.; PÉREZ-JUAN, P. Extraction of fatty acids from grape seed by superheated hexane. **Talanta**, v. 68, p. 126-130, 2005.

MAKRIS, D. P.; BOSKOU, G.; ANDRIKOPOULOS, N. K. Polyphenolic content and *in vitro* antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. **J. Food Comp. Anal.**, v. 20, p. 125-132, 2007.



MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 16, n. 1, p. 77-84, 2005.

MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **J. American Oil Chemist's Society**, v. 45, p. 594-598, 1968.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **J. American Oil Chemist's Society**, v. 48, p. 91, 1971.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJÓ, C. J. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.

NEGRO, C.; TOMMASI, L.; MICELI, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 41-44, 2003.

ORAK, H. H. Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations. **Scientia Horticulturae**, v. 111, p. 235-241, 2007.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 4619-4626, 2001.

PASTRANA-BONILLA, E.; AKOH, C. C.; SELLAPPAN, S.; KREWER, G. Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Muscadine Grapes. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 5497-5503, 2003.

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

PINELO, M.; RUBILAR, M.; JEREZ, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, J. M. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of

extracts from different components of grape pomace, **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 2111-2117, 2005.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

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

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN-CALDENTY, K.-M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **J. Applied Microbiology**, v. 90, p. 494-507, 2001.

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

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 20, p. 933-956, 1996.

ROSSI, J. A. J.; SINGLETON, V. L. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal Enol. Vitic.**, v. 16, p. 144-158, 1965.

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

SHUI, G.; LEONG, L. P. Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. **Food Chemistry**, v. 97, p. 277-284, 2006.

SILVA, S.; MATIAS, A.; NUNES, A. Identification of flavonol glycosides in winemaking by-products by HPLC with different detectors and hyphenated with mass spectrometry. **Ciência Téc. Vitiv.**, v. 20, n. 1, p. 17-33, 2005.

SOUQUET, J. M.; LABARBE, B.; LE GUERNEVÉ, C.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Phenolic composition of grape stems. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 1076-1080, 2000.

SUN, T.; HO, C. Antioxidant activities of buckwheat extracts. **Food Chemistry**, v. 90, p. 743-749, 2005.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **J. Food Comp. Analysis**, v. 19, p. 669-675, 2006.

TROIANI, E. P.; TROPIANI, C. T.; CLEMENTE, D. Peroxidase (POD) and Polyphenoloxidase (PPO) in grape (*Vitis Vinifera* L.). **Ciênc. Agrotec.**, v. 27, n. 3, p. 635-642, 2003.

VALDERRAMA, P.; MARANFONI, F.; CLEMENTE, E. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 21, p. 321-325, 2001.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Health aspects of functional grape seed constituents. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, p. 422-433, 2004.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. **J. Food Comp. Analysis**, v. 19, p. 41-48, 2006.

YU, L.; HALEY, S.; PERRET, J.; HARRIS, M. Antioxidant properties of hard winter wheat extracts. **Food Chemistry**, v. 78, p. 457-461, 2002.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq/Capes pelo auxílio financeiro, e a EPAGRI (Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária) de Videira, Estado de Santa Catarina, pelo fornecimento das amostras.

## CAPÍTULO 3

### ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE BAGAÇO DE UVA DAS VARIEDADES REGENTE E PINOT NOIR (*VITIS VINIFERA L.*)

#### **Artigo publicado.**

ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; GONZAGA, L. V.; FETT, R. Atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva das variedades Regente e Pinot Noir (*Vitis vinifera L.*). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 2, p. 158-163, 2007.

## **ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE BAGAÇO DE UVA DAS VARIEDADES REGENTE E PINOT NOIR (*VITIS VINIFERA* L.)**

Ismael Ivan ROCKENBACH\*, Graciela Lessa da SILVA, Eliseu RODRIGUES, Luciano Valdemiro GONZAGA, Roseane FETT

\* Endereço para correspondência: Centro de Ciências Agrárias, Rod. Admar Gonzaga 1346, Itacorubi, CEP: 88034-001, Florianópolis, SC, e-mail: ismael.rockenbach@gmail.com  
Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

### **RESUMO**

Bagaço de uva (*Vitis vinifera* L.) das variedades Pinot Noir e Regente, coletadas no município de Videira, Santa Catarina, foram analisadas quanto ao conteúdo total de polifenóis e capacidade antioxidante. Foram utilizados sistemas solventes aquosos a 50% (v/v) de metanol, etanol e acetona acidificados (HCl 0,1%). O conteúdo de fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu e a atividade antioxidante pelos métodos de seqüestro de radicais livres ABTS e DPPH e pelo método  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. A acetona apresentou maior conteúdo de polifenóis totais, atingindo, em peso seco, 7852 mg GAE/100g na variedade Pinot Noir e 5334 mg GAE/100g na variedade Regente. A atividade antioxidante média das variedades Pinot Noir e Regente foi, respectivamente, de 477 e 419  $\mu$ Mol TEAC/g pelo método ABTS e 480 e 479  $\mu$ Mol TEAC/g pelo método DPPH. No ensaio da co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico os extratos etanólicos apresentaram maior sinergismo quando associados ao BHT, com 92,6% e 90,9% de inibição da oxidação com 200  $\mu$ L para a variedade Regente e Pinot Noir, semelhante ao BHT com 200  $\mu$ L, apresentando 91,7% de inibição da oxidação. Os extratos de bagaço de uva apresentaram potencial antioxidante atuando como inibidores de radicais livres, ou atuando em sinergismo com o antioxidante sintético.

**Palavras-chave.** Atividade antioxidante, polifenóis, bagaço de uva.

### **ABSTRACT**

Grape (*Vitis vinifera* L.) pomace from Pinot Noir and Regente varieties, collected in Videira, Santa Catarina, were evaluated in order to determine its total polyphenol content and

antioxidant capacity. Acidified (HCl 0.1%) aqueous solvent systems of 50% (v.v<sup>-1</sup>) methanol, ethanol and acetone were used. Total polyphenol content was determined by Folin-Ciocalteu method and antioxidant activity was determined by ABTS, DPPH and  $\beta$ -carotene/linoleic acid methods. Acetone presented the higher total polyphenol content, reaching, in dry matter, 7852 mg GAE/100g in Pinot Noir variety and 5334 mg GAE/100g in Regente variety. Averaged antioxidant activity of Pinot Noir and Regente varieties was, respectively, of 477 and 419  $\mu$ Mol TEAC/g by ABTS method and 480 and 479  $\mu$ Mol TEAC/g by DPPH method. In  $\beta$ -carotene/linoleic acid method, ethanolic extracts presented higher synergism when associated to BHT, with 92.6% and 90.9% of inhibition of the oxidation with 200  $\mu$ L for Regente and Pinot Noir varieties, similar to BHT with 200  $\mu$ L, presenting 91.7% of inhibition of the oxidation. Extracts of grape pomace presented antioxidant potential, acting as inhibitors of free-radicals or in synergism with a synthetic antioxidant.

**Keywords:** Antioxidant activity, polyphenols, grape pomace.

## 1 INTRODUÇÃO

O crescente interesse nas propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos em vegetais e frutas deriva de sua forte atividade e baixa toxicidade comparada com antioxidantes fenólicos sintéticos, tal como o BHT (butil hidroxitolueno), BHA (butil hidroxianisol), PG (Propil Galato) e TBHQ (terc-butyl-hidroxiquinona)<sup>1,2</sup>.

Os resíduos da produção de vinho são caracterizados por conter altos teores de compostos fenólicos devido à extração insuficiente durante a vinificação. Segundo Shrikhande<sup>3</sup> os extratos de cascas de uva, consistindo de antocianinas das cascas e procianidinas das sementes, são fontes importantes de polifenóis. Sementes e cascas são normalmente descartadas nas operações de suco e vinho branco antes do processamento. Esses resíduos não fermentados tornam-se então valiosos para a extração de polifenóis. Os subprodutos obtidos após exploração da vinificação, tanto as sementes como o bagaço, constituem uma fonte muito barata para a extração de flavonóides antioxidantes, podendo ser utilizados como suplementos alimentares, ou na produção de fitoquímicos, proporcionando vantajosa importância econômica<sup>4,5,6</sup>.

A proposta deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante de extratos dos resíduos do processo de vinificação das variedades Regente e Pinot Noir, cultivadas no município de Videira, Santa Catarina.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

## 2.1 Material

Foram utilizadas amostras de bagaço de uvas vermelhas (*Vitis vinifera* L., variedades Pinot Noir e Regente) coletadas no município de Videira, Santa Catarina, resultantes da safra de 2005/2006, cedidas pela EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina). O município de Videira localiza-se a uma latitude de 27°00', longitude de 51°09', estando a uma altitude de 779,1 metros acima do nível do mar<sup>7</sup>, possui clima úmido do tipo temperado, com as estações bem definidas e temperaturas médias que variam de 35°C no verão a 0°C no inverno.

Com o objetivo de preservar as propriedades gerais dos bagaços, os exemplares foram acondicionados em caixas isotérmicas contendo gelo, sendo encaminhadas imediatamente para laboratório, onde foram armazenados à temperatura de  $-18,0 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  por 15 dias até as análises.

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Preparação dos extratos

O conteúdo em peso seco dos bagaços foi obtido em estufa a 105°C, até peso constante. Para obtenção dos extratos, as amostras do bagaço de uva das variedades Pinot Noir e Regente foram submetidas a tratamento térmico à 80°C, num período de 10 min, para inativação enzimática<sup>8,9</sup>. Posteriormente, foram secas em estufa de ar circulante, a temperatura de 50°C, por 24 horas. Após resfriamento em dessecador, as amostras foram trituradas (60 mesh) e desgorduradas em extrator de Soxhlet, utilizando-se hexano, durante 6 horas. Os extratos foram preparados com 1,5 g de material seco e 2 x 25mL de solvente, utilizando soluções aquosas a 50% (v/v) de metanol, etanol e acetona acidificados com HCl a 0,1% sob agitação mecânica e ao abrigo da luz, durante um período de 2 horas. Os extratos foram filtrados em papel filtro Whatman nº 1 e transferidos para balão volumétrico, sendo o volume final ajustado para 50 mL.

### 2.2.2 Determinação do Conteúdo de Polifenóis Totais (PT)

O conteúdo total de polifenóis em cada extrato de bagaço de uva foi determinado espectrofotometricamente de acordo com o método de Folin-Ciocalteu<sup>10</sup>, com a leitura da absorbância em 764 nm, e os resultados expressos em miligramas de equivalentes a ácido gálico (GAE) por 100 gramas de extrato seco.

### 2.2.3 Determinação da capacidade antioxidante – seqüestro de radicais livres do ABTS\*+



Para determinar a atividade antioxidante utilizou-se o método ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico) descrito por Re et al.<sup>11</sup>. A absorbância foi medida em espectrofotômetro modelo Hewlett-Packard 8425A, no tempo de 7 minutos após a adição da amostra. A capacidade antioxidante total da amostra foi calculada em  $\mu\text{Mol/g}$  de TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox)<sup>12</sup>.

#### **2.2.4 Determinação da capacidade antioxidante – método DPPH**

Desenvolvido por Brand-Williams et al.<sup>13</sup>, o método DPPH tem como base a redução da absorbância na região visível de comprimento de onda de 515 nm do radical DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) por antioxidantes. Foram aplicadas modificações de Kim et al.<sup>14</sup>, que utilizam o método com base na absorbância do radical DPPH<sup>•</sup> 100  $\mu\text{M}$  (2,9 mL) dissolvido em metanol a 80% no comprimento de onda de 517 nm. Os resultados são expressos em Trolox ( $\mu\text{Mol TEAC/g}$  de amostra).

#### **2.2.5 Determinação da capacidade antioxidante - sistema de co-oxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoléico**

A capacidade antioxidante também foi avaliada pelo método de descoloramento do  $\beta$ -caroteno descrito por Marco<sup>15</sup> e modificado por Miller<sup>16</sup>. Uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  da solução de  $\beta$ -caroteno (20 mg/mL em clorofórmio) foi colocada em um frasco erlenmeyer de 250 mL com 40  $\mu\text{L}$  de ácido linoléico, 1 mL de clorofórmio e 20 mg de Tween 40. Após homogeneização, o clorofórmio foi completamente evaporado com nitrogênio. Ao erlenmeyer foram adicionados 150 mL de água deionizada (previamente submetida a tratamento com atmosfera de oxigênio, durante 30 minutos). A emulsão apresentou-se límpida e sua absorbância foi ajustada entre 0,6 e 0,7 a 470 nm. Diferentes alíquotas (50, 100 e 200  $\mu\text{L}$ ) de soluções a 100 ppm dos extratos foram comparadas ao controle (sem antioxidante) e à solução de BHT (butil hidroxitolueno) a 100 ppm, utilizado como antioxidante padrão. Além disso, o efeito sinérgico foi avaliado utilizando-se misturas das soluções de extratos com a solução de BHT (1:1). Uma leitura inicial da absorbância foi feita imediatamente após a adição das soluções de extratos e do padrão ao sistema. Posteriormente, a absorbância foi monitorada a cada 15 min, durante 2 horas. As cubetas foram mantidas em banho-maria a 50°C durante as leituras. A atividade antioxidante foi calculada em termos de percentual de inibição, relativo ao controle, de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left( \frac{A_i - A_f}{C_i - C_f} \times 100 \right)$$

$A_i$  = absorvância inicial da solução de extrato

$A_f$  = absorvância final da solução de extrato

$C_i$  = absorvância inicial da solução controle

$C_f$  = absorvância final da solução controle

### 2.3 Análise Estatística

Realizou-se análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para identificar diferenças significativas entre as médias através do software Statistica<sup>®</sup> 6.0, ao nível de 5% de significância ( $P < 0,05$ ).

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Conteúdo de Polifenóis Totais

A concentração de polifenóis totais foi maior no extrato aquoso de acetona, seguido pelo extrato etanólico e metanólico para as variedades Pinot Noir e Regente (Tabelas 5 e 6), respectivamente. Houve diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) apenas para o extrato metanólico da variedade Regente, que apresentou menor teor de compostos fenólicos.

Llobera e Cañellas<sup>17</sup> realizaram um estudo com o bagaço de uvas vermelhas variedade Manto Negro (*Vitis vinifera* L.) e encontraram valores de compostos fenólicos de 2630 mg GAE/100g em peso seco, sendo estes valores inferiores aos encontrados em nosso estudo. Em outro estudo Yilmaz e Toledo<sup>18</sup> determinaram o conteúdo de polifenóis totais em semente de uva utilizando diferentes sistemas solventes. Foram encontrados valores, em peso seco, em torno de 2800 mg GAE/100g utilizando soluções aquosas de etanol (50, 60 e 70%), 3000 mg GAE/100g em soluções aquosas metanólicas (60 ou 70%) e valores em torno de 4000 mg GAE/100g quando utilizadas soluções aquosas de acetona (50 ou 75%).

Levando em consideração que as concentrações de polifenóis totais encontradas em nosso estudo atingem, em peso seco, 7852 mg GAE/100g no extrato acetônico da variedade Pinot Noir, pode-se dizer que os subprodutos da vinificação, como cascas e sementes,

representam uma fonte rica de produtos de alto valor, sendo caracterizados pelo elevado conteúdo de polifenóis<sup>4,5,19,6</sup>.

**Tabela 5.** Conteúdo de polifenóis totais (PT) e Atividade antioxidante (ABTS e DPPH) de extratos de bagaço de uva variedade Pinot Noir (solventes a 50% em meio aquoso acidificado com HCl 0,1% v/v).

Amostras	PT (mg GAE/100g de bagaço)		DPPH – TEAC <sup>c</sup>	ABTS – TEAC <sup>c</sup>
	PS <sup>a</sup>	PF <sup>b</sup>		
Etanol	7173 ± 381 a	1650 ± 88 a	450 ± 14 a	471 ± 12 a
Metanol	7073 ± 389 a	1627 ± 89 a	438 ± 11 a	436 ± 57 a
Acetona	7852 ± 291 a	1806 ± 67 a	551 ± 7 b	523 ± 24 a

Resultados expressos como média ± desvio padrão, n = 3.

<sup>a</sup> PS: Peso seco; <sup>b</sup> PF: Peso fresco (77% de umidade); <sup>c</sup> TEAC: atividade antioxidante equivalente ao Trolox (µMol TEAC/g).

Letras diferentes em uma mesma coluna representam diferença estatística (Tukey HSD, P <0,05).

Kuskoski et al.<sup>20</sup> realizaram pesquisa com a polpa de abacaxi, cupuaçu, maracujá, graviola e uva, e encontraram valores de compostos fenólicos de 21,7; 20,5; 20,0; 84,3 e 117,1 mg GAE/100g em peso fresco. Em outro estudo Sun et al.<sup>21</sup> encontraram em frutas como uva (182,0 ± 2,6 mg/100g), morango (147,8 ± 1,1 mg/100g) e abacaxi (40,4 ± 1,0 mg/100g), valores de compostos fenólicos totais, em peso fresco, inferiores aos encontrados em nosso estudo com bagaço de uva, que foram de 1806 e 1067 mg GAE/100g, para Pinot Noir e Regente, respectivamente.

**Tabela 6.** Conteúdo de polifenóis totais (PT) e Atividade antioxidante (ABTS e DPPH) de extratos de bagaço de uva variedade Regente (solventes a 50% em meio aquoso acidificado com HCl 0,1% v/v).

Amostras	PT (mg GAE/100g de bagaço)		DPPH – TEAC <sup>c</sup>	ABTS – TEAC <sup>c</sup>
	PS <sup>a</sup>	PF <sup>b</sup>		
Etanol	5230 ± 96 b	1046 ± 19 b	439 ± 18 a	357 ± 12 a
Metanol	4354 ± 98 a	871 ± 20 a	443 ± 12 a	454 ± 20 b
Acetona	5334 ± 13 b	1067 ± 3 b	556 ± 12 b	447 ± 15 b

Resultados expressos como média ± desvio padrão, n = 3.

<sup>a</sup> PS: Peso seco; <sup>b</sup> PF: Peso fresco (80% de umidade); <sup>c</sup> TEAC: atividade antioxidante equivalente ao Trolox (µMol TEAC/g).

Letras diferentes em uma mesma coluna representam diferença estatística (Tukey HSD, P <0,05).

### 3.2 Atividade Antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH

Os valores médios encontrados em nosso estudo considerando-se os diferentes solventes são, respectivamente, 477 e 419  $\mu\text{Mol TEAC/g}$  pelo método ABTS e 480 e 479  $\mu\text{Mol TEAC/g}$  pelo método DPPH para Pinot Noir e Regente (Tabelas 5 e 6), respectivamente. Para a variedade Pinot Noir o extrato acetônico apresentou maior atividade pelo método DPPH, não havendo diferença significativa entre os extratos pelo método ABTS ( $P < 0,05$ ). Para a variedade Regente o extrato acetônico apresentou maior atividade pelo método DPPH. Enquanto que pelo método ABTS o extrato metanólico apresentou maior atividade em relação ao extrato acetônico, porém sem apresentar diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

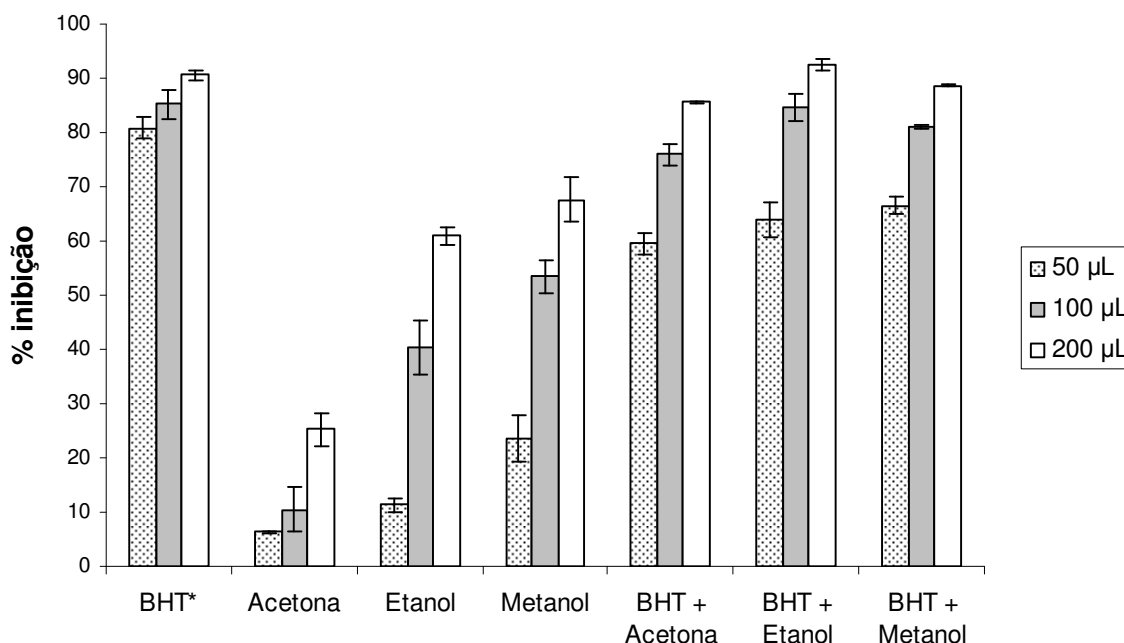
A atividade antioxidante média encontrada no bagaço das uvas é relativamente elevada quando comparada com frutas ricas em antocianinas, como morango (20,6  $\mu\text{Mol TEAC/g}$  peso fresco ORAC), descrita por Kalt et al.<sup>22</sup>, suco de uva e de amora (8,11 – 38,29  $\mu\text{Mol TEAC/g}$  peso fresco pelo método ABTS), descrita por Sellappan et al.<sup>23</sup>; polpa de açaí (48,6  $\mu\text{Mol/mL ORAC}$ ), determinada por Del Pozo-Insfran et al.<sup>24</sup>; e suco de uva tinta (14,6 – 25,0  $\mu\text{Mol TEAC/mL}$ ), descrita por Dávalos et al.<sup>25</sup>.

Em outro estudo Kuskoski et al.<sup>26</sup> determinaram atividade antioxidante das polpas de frutas de grande consumo no mercado sul brasileiro (amora, uva, açaí, goiaba, morango, acerola, abacaxi, manga, graviola, cupuaçu e maracujá), aplicando método ABTS. Os valores de atividade antioxidante equivalente ao Trolox obtidos oscilam entre valores mínimos e máximos de 2,0 e 67,6  $\mu\text{Mol TEAC/g}$  em peso fresco.

### 3.3 Atividade Antioxidante através do sistema $\beta$ -caroteno/ ácido linoléico

A ação antioxidante dos extratos acetônico, etanólico e metanólico do bagaço das duas variedades de uva também foi avaliada através do sistema modelo  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. O método avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. A Figura 7 mostra as porcentagens de inibição da oxidação dos extratos acetônico, etanólico e metanólico da variedade Regente. O extrato metanólico teve maiores valores de atividade antioxidante, que indicou com 200  $\mu\text{L}$  a melhor proteção contra o processo de oxidação, com uma média de 67,5%, seguido por 53,5% de inibição da oxidação pela mesma amostra com 100  $\mu\text{L}$ . Na variedade Pinot Noir (Figura 8) o extrato etanólico teve maiores valores de atividade antioxidante, indicando com 200  $\mu\text{L}$  a melhor proteção contra o

processo de oxidação com uma média de 63,6%, seguido por 41,1% de inibição da oxidação pela mesma amostra com 100  $\mu\text{L}$ .



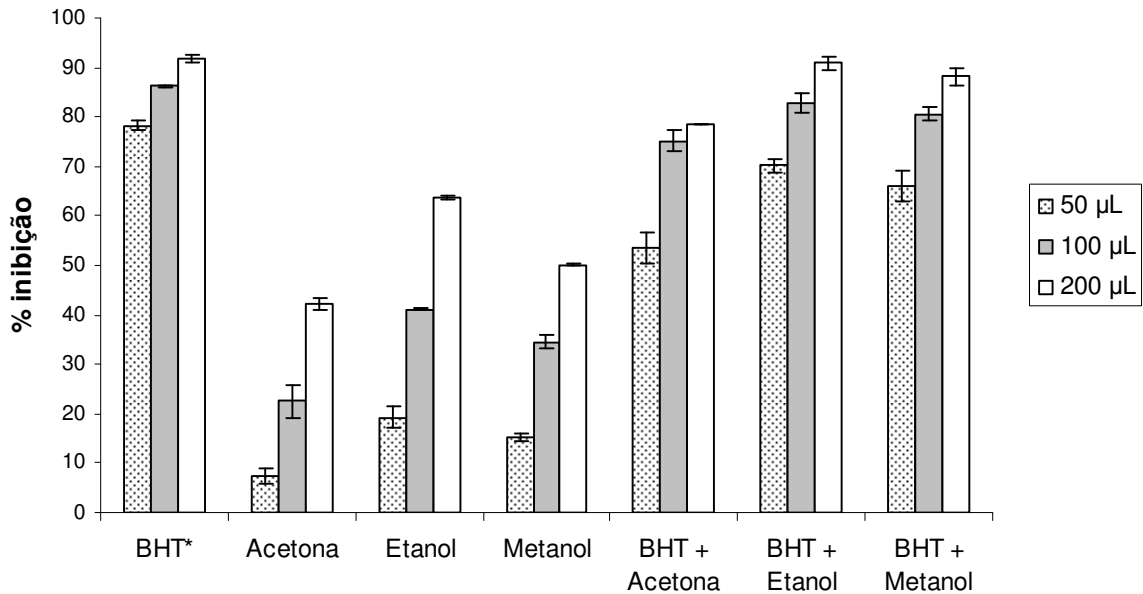
\* BHT - butil hidroxitolueno

**Figura 7.** Atividade antioxidante dos extratos acetônico, etanólico e metanólico do bagaço de uva variedade Regente determinada pela oxidação acoplada do  $\beta$ -caroteno/ ácido linoléico.

Estes resultados são inferiores aos dados apresentados no estudo de Moreira e Mancini-Filho<sup>27</sup>, onde o extrato aquoso de mostarda a 200 ppm apresentou 72% de inibição da oxidação, e o extrato etéreo de canela indicou 83% de atividade antioxidante. Em outro estudo Jayaprakasha et al.<sup>28</sup>, utilizando diferentes sistemas solventes em extratos de semente de uva, obtiveram 89,3% de inibição com acetato de etila em meio aquoso (proporção 17:3).

Os dados demonstram que o percentual de inibição da oxidação é dose-dependente, ou seja, aumenta com a elevação do volume de solução de extrato aplicada. Outro fato relevante a ser observado é que, ao contrário dos resultados de ABTS e DPPH, os extratos acetônicos foram menos efetivos no ensaio do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico em comparação com os extratos metanólico e etanólico. Este fato pode estar relacionado com a composição fenólica dos extratos, provavelmente determinada pelas características de afinidade polar entre solvente e compostos fenólicos. Frankel et al.<sup>29</sup> observaram que antioxidantes de caráter polar

apresentaram maior capacidade antioxidante em sistemas de caráter mais apolar, sendo observado o contrário para antioxidantes de caráter apolar.



\* BHT - butil hidroxitolueno

**Figura 8.** Atividade antioxidante dos extratos acetônico, etanólico e metanólico do bagaço de uva variedade Pinot Noir determinada pela oxidação acoplada do  $\beta$ -caroteno/ ácido linoléico.

Além disso, o extrato etanólico das duas variedades foi o que melhor apresentou sinergismo quando associado ao BHT. A mistura, com volume de 200  $\mu$ L, de antioxidante sintético e extrato (1:1) teve uma performance na inibição da oxidação semelhante, de 92,6% para a variedade Regente e 90,9% para a variedade Pinot Noir, ao BHT puro quando aplicado o mesmo volume, com 91,7% de inibição nos ensaios para as duas variedades.

#### 4 CONCLUSÃO

Considerando que o bagaço de uva é resíduo obtido a partir da separação do mosto na vinificação, o conteúdo total de compostos fenólicos que permanece no bagaço é elevado, comparando-se com a polpa de algumas frutas como abacaxi, cupuaçu, maracujá, graviola e uva.

Os extratos de bagaço de uva avaliados apresentaram potencial antioxidante atuando como inibidores de radicais livres, ou atuando em sinergismo com o antioxidante sintético BHT.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq/Capes pelo auxílio financeiro, e a EPAGRI (Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária) de Videira, Estado de Santa Catarina, pelo fornecimento das amostras.

## REFERÊNCIAS

1. Marinova EM, Yanishlieva NV. Antioxidative activity of extracts from selected species of the family Lamiaceae in sunflower oil. *Food Chem* 1997; 58 (3): 245-8.
2. Nakatani N. Antioxidant from spices and herbs. In: Shahidi F, editor. *Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications*. Champaign: AOCS Press; 1997. p. 64-75.
3. Shrikhande AJ. Wine by-products with health benefits. *Food Res Int* 2000; 33: 469-74.
4. Alonso A, Guilleán D, Barroso C, Puertas B, Garcia A. Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 5832-6.
5. Negro C, Tommasi L, Miceli A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technol* 2003; 87: 41-4.
6. González-Paramas A, Esteban-Ruano S, Santos-Buelga C, Pascual-Teresa S, Rivas-Gonzalo J. Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 234-8.
7. Massignam AM, Dittrich RC. Estimativa do número médio e da probabilidade mensal de ocorrência de geadas para o Estado de Santa Catarina. *R Bras Agromet* 1998; 6 (2): 213-20.
8. Valderrama P, Marangoni F, Clemente E. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em Maçã (*Mallus comunis*). *Ciênc Tecnol Aliment* 2001; 21 (3): 321-5.
9. Troiani EP, Tropiani CT, Clemente D. Peroxidase (POD) and Polyphenoloxidase (PPO) in grape (*Vitis vinifera* L.). *Ciênc Agrotec* 2003; 27 (3): 635-42.
10. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticul* 1965; 16: 144-58.

11. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med* 1999; 26: 1231-7.
12. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Bio Med* 1996; 20: 933-56.
13. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss Technol* 1995; 22: 25-30.
14. Kim D-O, Lee KW, Lee HJ, Lee CY. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 3713-7.
15. Marco GJ. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 1968; 45: 594-8.
16. Miller HE. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 1971; 48: 91.
17. Llobera A, Cañellas J. Dietary fibre content and antioxidant activity of Mano Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. *Food Chem* 2007; 101: 659-66.
18. Yilmaz Y, Toledo R. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry by products and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *J Food Compos Anal* 2006; 19: 41-8.
19. Kammerer D, Claus A, Carle R, Schieber A. Polyphenol screening of pomace from red and white grapevarieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 4360-7.
20. Kuskoski EM, Asuero AG, Morales MT, Fett R. Wild fruits and pulps of frozen fruits: antioxidant activity, polyphenols and anthocyanins. *Ciênc Rural* 2006; 36 (4): 1283-1287.
21. Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 7449-54.
22. Kalt W, Forney CF, Martin A, Prior RL. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J Agric Food Chem* 1999; 47: 4638-44.
23. Sellappan S, Akoh CC, Krewer G. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 2432-8.
24. Del Pozo-Insfran D, Brenes CH, Talcott ST. Phytochemical composition and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *J Agric Food Chem* 2004; 52: 1539-45.
25. Dávalos A, Bartolomé B, Gómez-Cordovés C. Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. *Food Chem* 2005; 93: 325-30.



26. Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc Tecnol Aliment* 2005; 25 (4): 726-32.
27. Moreira AVB, Mancini-Filho J. Atividade antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva doce em sistemas aquoso e lipídico. *Nutrire* 2003; 25: 31-46.
28. Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chem* 2001; 73: 285-90.
29. Frankel EN, Huang S-W, Kanner J, German JB. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. *J Agric Food Chem* 1994; 42: 1054-59.

## **CAPÍTULO 4**

### **ESTABILIDADE DE ANTOCIANINAS, COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE BAGAÇOS DE UVA (*VITIS VINIFERA* L.)**

**Artigo submetido à publicação na Revista *Brazilian Journal of Food Technology* do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL - SP.**

## ESTABILIDADE DE ANTOCIANINAS, COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE BAGAÇOS DE UVA (*VITIS VINIFERA* L.)

Ismael Ivan ROCKENBACH\*; Eliseu RODRIGUES; Luciano Valdemiro GONZAGA;  
Roseane FETT

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

\*Endereço para correspondência: Centro de Ciências Agrárias, Rod. Admar Gonzaga 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC, CEP: 88034-001, e-mail: ismael.rockenbach@gmail.com; rfett@cca.ufsc.br

### RESUMO

O bagaço de uva, subproduto da vinificação, é caracterizado como fonte de compostos fenólicos antioxidantes e de antocianinas. As antocianinas remanescentes no resíduo da vinificação constituem uma fonte potencial de corantes naturais, apresentando, contudo, problemas de estabilidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade das antocianinas, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total de resíduos secos e desengordurados obtidos a partir do bagaço de uva (*Vitis vinifera* L.) das variedades Ancelota, Tannat, Regente e Pinot Noir. No estudo da estabilidade das antocianinas no período de 298 dias, foram obtidos tempos de meia-vida de 1680, 1306, 868 e 343 dias para as variedades Ancelota, Tannat, Regente e Pinot Noir, respectivamente. Observou-se queda significativa ( $P < 0,05$ ) dos teores de fenólicos totais e atividade antioxidante, com exceção da variedade Tannat. A partir dos dados obtidos, conclui-se que as antocianinas do bagaço apresentaram boa estabilidade, com tempos de meia-vida que permitem o armazenamento e aproveitamento do bagaço como fonte natural de corantes e antioxidantes em períodos de entressafra da uva.

**Palavras-chave:** resíduo, antocianinas, corantes naturais, tempo de meia-vida.

### ABSTRACT

Grape pomace, a vinification byproduct, is known as a source of phenolics, antioxidants and anthocyanins. Pomace remaining anthocyanins consist of a potential source of natural colorants that present problems of stability. The aim of this work was to evaluate stability of anthocyanins, total phenolics compounds and total antioxidant activity of dry and defatted residues from pomace of the following grape varieties: Ancelota, Tannat, Regente and Pinot

Noir. Studying the anthocyanins stability during 298 days, half-life times of 1680, 1306, 868 and 343 days were obtained for varieties Ancelota, Tannat, Regente and Pinot Noir, respectively. Decreasing in total phenolics compounds and antioxidant activity was also observed ( $P < 0.05$ ), with the exception for Tannat variety. Anthocyanins of analyzed pomaces presented good stability, with half-life times that allows the storage and using of pomace as a natural source of colorants and antioxidants in inter-harvest periods.

**Keywords:** residue, anthocyanins, natural colorants, half-life time.

## 1 INTRODUÇÃO

Os principais fenólicos presentes na uva são os flavonóides (antocianinas, flavanóis e flavonóis), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos) e uma larga variedade de taninos (FRANCIS, 2000). O bagaço da uva, por sua vez, é caracterizado pelo alto conteúdo de compostos fenólicos que permanecem após o processo de vinificação (ARVANITOYANNIS *et al.*, 2006). Os compostos fenólicos dos resíduos da vinificação possuem alta capacidade antioxidante, tendo, como consequência, potenciais benefícios para a saúde (ALONSO *et al.*, 2002).

Entre esses compostos estão as antocianinas, que permanecem em grande quantidade no bagaço, visto que durante o contato das cascas da uva com o mosto na fermentação não há uma extração completa desses pigmentos (SINGLETON & ESAU, 1969). As antocianinas são flavonóides que se encontram largamente distribuídos na natureza e são responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e todas as tonalidades de vermelho que aparecem em flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas (MARKAKIS, 1982; VINSON *et al.*, 1999). São consideradas potenciais substitutos aos corantes sintéticos devido ao seu brilho, cor atrativa e solubilidade em água, que permite sua incorporação em uma variedade de matrizes alimentares (BORDIGNON-LUIZ *et al.*, 2007), sendo de interesse para a indústria de alimentos, cosméticos e farmacêutica (GÓMEZ-PLAZA *et al.*, 2006). Apesar de largamente disseminadas na natureza são poucas as fontes comercialmente utilizáveis de antocianinas. Entre essas fontes pode-se citar o resíduo da fabricação do vinho e do suco de uva que produz o pigmento usado em alimentos com o nome de enocianina (MALACRIDA & MOTTA, 2006).

Embora as antocianinas apresentem grande potencial para serem utilizadas como corantes naturais, elas apresentam problemas de estabilidade (GÓMEZ-PLAZA *et al.*, 2006). Segundo SARNI-MANCHADO *et al.* (1996), a presença de luz implica na perda significativa da cor das antocianinas. De acordo com FRANCIS (1989), os principais fatores que

influenciam a estabilidade das antocianinas são a estrutura química, o pH, a temperatura, a luz, a presença de oxigênio, a degradação enzimática e as interações com os componentes dos alimentos, tais como ácido ascórbico, íons metálicos, açúcares e copigmentos.

Neste trabalho o objetivo foi avaliar a estabilidade das antocianinas, dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante do bagaço de uva de diferentes variedades (*Vitis vinifera* L.).

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material**

Foram utilizadas amostras de bagaço das uvas tintas *Vitis vinifera* L., variedades Tannat, Ancelota, Regente e Pinot Noir, coletadas na região de Videira, Santa Catarina. As amostras foram resultantes da safra de 2005/2006, sendo cedidas pela EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina). Tendo por objetivo preservar as propriedades gerais dos bagaços, os exemplares foram acondicionados em caixas isotérmicas contendo gelo e encaminhados imediatamente ao laboratório, onde foram armazenados à temperatura de  $-18,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$  e posteriormente analisados.

### **2.2 Métodos**

#### **2.2.1 Preparo das amostras**

As amostras de bagaço de uva foram submetidas a tratamento térmico de  $80^\circ\text{C}$  por 10 minutos em estufa com circulação de ar para inativação enzimática (VALDERRAMA *et al.*, 2001; TROIANI *et al.*, 2003). Posteriormente foram secas em temperatura de  $50^\circ\text{C}$ , por 24 horas. Após resfriamento em dessecador, as amostras foram trituradas (60 mesh) e desengorduradas em extrator Soxhlet, utilizando solvente hexano, durante 6 horas. Os resíduos obtidos foram acondicionados em tubos de ensaio com rosca protegidos da luz, em ambiente seco e arejado, e em temperatura de  $25^\circ\text{C}$ .

#### **2.2.2 Preparo dos extratos**

Os conteúdos de fenólicos totais e atividade antioxidante foram analisados no início e no final do experimento. Para isso, os extratos foram preparados com 2,5 g de material seco. Utilizou-se como solvente extrator solução de etanol 50 % (v.v<sup>-1</sup>) (CACACE & MAZZA, 2003), acidificada com HCl a 0,1 % (REVILLA *et al.*, 1998). A extração (3 x 25 mL) foi procedida sob agitação e ao abrigo da luz no intervalo de 2 horas, seguida de filtração com papel filtro Whatman nº 1.

Para a avaliação da estabilidade das antocianinas foram preparados extratos com água deionizada acidificada (HCl 0,1 % v.v<sup>-1</sup>), mantendo-se 150 minutos de agitação ao abrigo da luz.

### 2.2.3 Avaliação da estabilidade

A avaliação da estabilidade das antocianinas foi realizada considerando-se que a reação de degradação das antocianinas segue cinética de primeira ordem (CORMIER *et al.*, 1997; DEL POZO-INSFRAN *et al.*, 2004). Assim, foram determinados os valores da constante de velocidade da reação de degradação (k) e o tempo de meia-vida (t ½) dos pigmentos antociânicos (GARZÓN & WROLSTAD, 2001) a partir dos resultados obtidos nas leituras de absorvância dos extratos em um período de 298 dias, através das Equações 1 e 2:

$$\ln \left[ \frac{\text{Absorvância}(t)}{\text{Absorvância}(t_0)} \right] = k \times t \quad (\text{Equação 1})$$

$$\frac{0,693}{k} = t \frac{1}{2} \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo,

A<sub>tx</sub> = absorvância em função do tempo

A<sub>t0</sub> = absorvância no tempo zero

k = constante de velocidade de degradação

t = tempo (dias, horas, minutos, segundos)

t ½ = tempo de meia-vida.

### 2.2.4 Determinação do conteúdo de fenólicos totais

O conteúdo de fenólicos totais em cada extrato foi determinado espectrofotometricamente de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (ROSSI & SINGLETON, 1965) com a leitura da absorvância em 764 nm, e os resultados expressos em gramas de equivalentes a ácido gálico (GAE) por 100 gramas de extrato seco.

### 2.2.5 Determinação da atividade antioxidante

Para determinar a atividade antioxidante utilizou-se o método ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico)) descrito por RE *et al.* (1999). A absorvância foi medida

em espectrofotômetro modelo Hewlett-Packard 8425A, no tempo de 7 minutos. A atividade antioxidante total da amostra foi calculada em relação à atividade do antioxidante sintético Trolox, nas mesmas condições, e os resultados foram expressos em  $\mu\text{Mol TEAC.g}^{-1}$  (atividade antioxidante equivalente ao Trolox) (RICE-EVANS *et al.*, 1996).

### 2.3 Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada pela aplicação da ANOVA e o teste t visando identificar diferenças significativas entre as médias, usando o software Statistica<sup>®</sup> 6.0. O nível de significância considerado para a diferença entre as médias foi de 5 % ( $P < 0,05$ ). O experimento e as análises foram realizados em triplicata e os resultados apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tempos de meia-vida das antocianinas foram, respectivamente, de 1680, 1306, 868 e 343 dias para as variedades Ancelota, Tannat, Regente e Pinot Noir. As variedades Regente e Pinot Noir apresentaram tempo de meia-vida bastante inferior às demais. Esses valores são elevados na comparação com os valores observados no estudo de FALCÃO *et al.* (2004), que relataram tempo de meia-vida de 42 dias de extratos antociânicos de casca de uva Cabernet Sauvignon em pH 3,0, temperatura de 29 °C, ausência de luz e presença de oxigênio. Também são superiores ao tempo de meia-vida de pigmentos antociânicos obtidos de uva e adicionados em “sorbet”, uma espécie de sorvete, que foi de 234 dias no estudo de GRIS *et al.* (2004). Foram ainda bastante superiores ao tempo de meia-vida de 11 dias de extratos antociânicos na ausência de luz avaliados no estudo de PROVENZI *et al.* (2006).

Outros estudos realizados avaliaram estabilidade de pigmentos antociânicos levando em consideração diferentes fatores que interferem na estabilidade dos mesmos. No estudo de BORDIGNON-LUIZ *et al.* (2007) avaliou-se a estabilidade de antocianinas usando a copigmentação. Esses autores relataram aumento do tempo de meia-vida de antocianinas adicionadas de ácido tânico em sistema modelo, de aproximadamente 55 para 128 dias na ausência de luz e oxigênio, com grande influência do controle de fatores como temperatura, luz, pH e atmosfera. O aumento da estabilidade das antocianinas ao descolorimento pode, portanto, ser realizada através da copigmentação, especialmente com os flavonóis, que exercem uma ação protetora sobre as moléculas de antocianinas (LIMA *et al.*, 2000).

O sistema em que as antocianinas estão presentes influencia fortemente sua estabilidade, como demonstrado no estudo de GARZÓN & WROLSTAD (2002), com taxa de

degradação maior na polpa em comparação com o suco de morango. O tempo de meia-vida observado foi de 3,5 dias na polpa e 8 dias no suco. Nesses sistemas, o tempo de meia-vida dos pigmentos foi bem menor que o observado em nosso estudo, no qual a matriz original da parede vegetal do resíduo de uva auxilia na preservação de condições necessárias para a estabilidade dos pigmentos.

A presença de antocianinas em sistemas com reduzida atividade de água, como no resíduo de bagaço de uva seco e desengordurado, favorece a estabilidade desses pigmentos de acordo com o estudo de GARZÓN & WROLSTAD (2001), que demonstraram uma relação direta entre o aumento da atividade de água e a degradação de antocianinas. Esses autores também afirmam que devido à complexidade das reações químicas que ocorrem em sistemas naturais, como sucos, polpas, doces e geléias, torna-se difícil isolar um fator único que justifique as mudanças nas antocianinas. A degradação das antocianinas pode ocorrer ainda pela ação de enzimas endógenas presentes nos tecidos das plantas, tais como glicosidases, polifenol oxidases e peroxidases (FRANCIS, 1989). O processo de inativação enzimática aplicado na preparação das amostras do bagaço de uva pode ter contribuído, portanto, para a maior conservação dos pigmentos no resíduo do bagaço.

Os valores de fenólicos totais e atividade antioxidante observados no início e no final do experimento são apresentados na **Tabela 7**.

**Tabela 7.** Estabilidade do Conteúdo de Fenólicos Totais (FT) e Atividade Antioxidante (TEAC) de bagaços de uva (*Vitis vinifera* L.).

Variedade	FT <sup>1</sup> (g GAE.100g <sup>-1</sup> )		ABTS – TEAC <sup>2</sup> (µMol.g <sup>-1</sup> )	
	0 dias	298 dias	0 dias	298 dias
Ancelota	7,32±0,31 a	5,20±0,13 b	400,67±6,18 a	364,66±9,53 b
Tannat	5,84±0,14 a	5,34±0,28 a	341,49±3,50 a	340,90±7,21 a
Regente	5,23±0,63 a	4,37±0,14 b	453,55±20,16 a	255,54±18,98 b
Pinot Noir	7,17±0,31 a	5,74±0,25 b	470,59±11,69 a	328,75±13,12 b

Valores, em peso seco, expressos como média ± desvio-padrão, n = 3.

Letras diferentes na mesma linha para valores inicial e final em cada parâmetro representam diferença estatisticamente significativa (P<0,05).

<sup>1</sup> Equivalente a ácido gálico. <sup>2</sup> Atividade antioxidante equivalente ao Trolox.

A diminuição nos teores de compostos fenólicos totais dos resíduos foi significativa (P<0,05), acompanhada pela queda da atividade antioxidante. Para estes parâmetros não houve diminuição significativa apenas para a variedade Tannat, evidenciando a relação entre o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante, demonstrada em diversos estudos.



#### 4 CONCLUSÕES

As antocianinas presentes nos bagaços apresentaram boa estabilidade, com tempos de meia-vida que permitem o armazenamento e aproveitamento do bagaço como fonte natural de corantes e antioxidantes.

Durante o armazenamento os teores de fenólicos totais e atividade antioxidante apresentaram diminuição significativa para a maioria das variedades avaliadas.

A obtenção de dados ainda mais conclusivos relativos ao bagaço de uva tinta podem ser alcançados em trabalhos posteriores com outros cultivares difundidos no setor vitivinícola brasileiro.

#### AGRADECIMENTOS

Ao CNPq/Capes pelo auxílio financeiro, e a EPAGRI (Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária) pelo fornecimento das amostras.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, A.M.; GUILLÉN, D.A.; BARROSO, C.G.; PUERTAS, B.; GARCÍA, A. Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5832-5836, 2002.

ARVANITOYANNIS, I.S.; LADAS, D.; MAVROMATIS, A. Potential uses and applications of treated wine waste: a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 475-487, 2006.

BORDIGNON-LUIZ, M.T.; GAUCHE, C.; GRIS, E.F.; FALCÃO, L.D. Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. **LWT – Food Science and Technology**, v. 40, n. 4, p. 594-599, 2007.

CACACE, J.E.; MAZZA, G. Optimization of Extraction of Anthocyanins from Black Currants with Aqueous Ethanol. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 1, p. 240-248, 2003.

CORMIER, F.; COUTURE, R.; DO, C.B.; PHAM, T.Q.; TONG, V.H. Properties of anthocyanins from grape cell culture. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 2, p. 246-248, 1997.

DEL POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C.H.; TALCOTT, S.T. Phytochemical composition and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1539-1545, 2004.

FALCÃO, L.D.; GAUCHE, C.; BARROS, D.M.; PRUDÊNCIO, E.S.; GRIS, E.F.; SANT'ANNA, E.S.; OGLIARI, P.J.; LUIZ, M.T.B. Stability of Anthocyanins from grape (*Vitis vinifera* L.) skins with tannic acid in a model system. **Italian Journal of Food Science**, n. 3, v. 16, p. 323-332, 2004.

FRANCIS, F.J. Food colorants: anthocyanins. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, v. 28, p. 273-314, 1989.

FRANCIS, F.J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. **Cereal Foods World**, v. 15, p. 208-213, 2000.

GARZÓN, G.A.; WROLSTAD, R.E. The stability of pelargonidin-based anthocyanins at varying water activity. **Food Chemistry**, v. 75, p. 185-196, 2001.

GARZÓN, G.A.; WROLSTAD, R.E. Comparison of the stability of pelargonidin-based anthocyanins in strawberry juice and concentrate. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 4, p. 1288-1299, 2002.

GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E. Anthocyanins. Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. In: Wrolstad, R.E. (Ed.) **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001. Unit. F1.2.1-13.

GÓMEZ-PLAZA, E.; MIÑANO, A.; LÓPEZ-ROCA, J.M. Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. **Food Chemistry**, v. 97, p. 87-94, 2006.

GRIS, E.F.; FALCÃO, L.D.; FERREIRA, E.A.; LUIZ, M.T.B. Avaliação do tempo de meia-vida de antocianinas de uvas Cabernet Sauvignon em "sorbet". **Boletim CEPPA**, v. 22, n. 2, p. 375-386, 2004.

LIMA, V.L.A.G.; MELO, E.A.; LIMA, L.S.; NASCIMENTO, P.P. Flavonóides em seleções de acerola (*Malpighia sp L.*). 1 – Teor de antocianinas e flavonóides totais. **Ciência Rural**, v. 30, n. 6, p. 1063-1064, 2000.

MALACRIDA, C.R.; MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: Composição e estabilidade. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 24, n. 1, p. 59-82, 2006.

MARKAKIS, P. Stability of anthocyanins in foods. In: MARKAKIS, P. (Ed.) **Anthocyanins as Food Colors**. New York: Academic Press, p. 163-180, 1982.

PROVENZI, G.; FALCÃO, L.D.; FETT, R.; LUIZ, M.T.B. Estabilidade de Antocianinas de uvas Cabernet Sauvignon com  $\beta$ - e  $\gamma$ -Ciclodextrinas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 3, p. 165-170, 2006.

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

REVILLA, E.; RYAN, J.M.; MARTÍN-ORTEGA, G. Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grape. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4592-4597, 1998.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

ROSSI, J.A.J.; SINGLETON, V.L. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SARNI-MANCHADO, P.S.; FULCRAND, H.; SOUQUET, J.M.; CHEYNIER, V.; MOUTONET, M. Stability and color of unreported wine anthocyanin-derived pigments. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 5, p. 938-941, 1996.

SINGLETON, V.; ESAU, P. Phenolic substances in grapes and wines and their significance. **New York: Academic Press, 1969.**

TROIANI, E.P.; TROPIANI, C.T.; CLEMENTE, D. Peroxidase (POD) and Polyphenoloxidase (PPO) in grape (*Vitis Vinifera* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 3, p. 635-642, 2003.

VALDERRAMA, P.; MARANFONI, F.; CLEMENTE, E. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p. 321-325, 2001.

VINSON, J.A.; JANG, J.; YANG, J.; DABBAGH, Y.; LIANG, X.; SERRY, M.; PROCH, J.; CAI, S. Vitamins and especially flavonoids in common beverages are powerful in vitro antioxidants wich enrich lower density lipoproteins and increase their oxidative resistance after ex vivo spiking in human plasma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 2502-2504, 1999.

WROLSTAD, R.E. **Colors and pigment analysis in fruit products**. Corvallis: Oregon Agricultural Experimental Station, 1976. 17 p.

## **CAPÍTULO 5**

### **PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE BAGAÇOS DE UVAS TINTAS (*VITIS VINIFERA* L. e *VITIS LABRUSCA* L.)**

**Artigo submetido à publicação na *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*.**

**PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE BAGAÇOS DE UVAS TINTAS (*VITIS VINIFERA*  
*L.* e *VITIS LABRUSCA L.*)**

Ismael Ivan ROCKENBACH<sup>1\*</sup>; Eliseu RODRIGUES<sup>1</sup>; Luciano Valdemiro GONZAGA<sup>1</sup>;  
Rosângela Pavan TORRES<sup>2</sup>; Jorge MANCINI-FILHO<sup>2</sup>; Roseane FETT<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, CEP: 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 14, Butantan, CEP: 05508-900, São Paulo, SP, Brasil.

\* Correspondência ao autor: Tel +55 - 48 - 3721 - 5374  
e-mail: ismael.rockenbach@gmail.com; rfett@cca.ufsc.br

**RESUMO**

O bagaço é caracterizado como subproduto da vinificação, contendo principalmente sementes e cascas. As sementes contêm a maior parte do óleo da uva, que nelas representa 14 a 17 %, variando conforme a variedade. Neste trabalho foi determinado o perfil de ácidos graxos do óleo obtido a partir do bagaço de oito variedades de uva (Pinot Noir, Regente, Ancelota, Tannat, Merlot, Bordô, Isabel e Cabernet Sauvignon) coletadas na cidade de Videira, Santa Catarina. Os ácidos graxos encontrados com maior abundância foram o linoléico (47,63 a 60,02 %), oléico (9,48 a 16,81 %), palmítico (6,17 a 8,46 %) e o esteárico (2,89 a 4,08 %). Os resultados obtidos demonstram que o óleo do bagaço das diferentes variedades analisadas é similar e apresenta alto teor de ácidos graxos poliinsaturados.

**Palavras-chave:** bagaço de uva, sementes, óleo, ácidos graxos.

**ABSTRACT**

Grape pomace is characterized as a by-product of winemaking that contains, mainly, seeds and peels. Seeds enclose the major content of oil in the fruit, ranging between 14 and 17 %, depending on the variety. This work determined the fatty acid profile of the oil obtained from pomace of eight grape varieties (Pinot Noir, Regente, Ancelota, Tannat, Merlot, Bordô, Isabel and Cabernet Sauvignon) collected in Videira, Santa Catarina. Fatty acids found in higher concentration were linoleic (47.63 to 60.02 %), oleic (9.48 to 16.81 %), palmitic (6.17 to 8.46

%) and stearic (2.89 to 4.08 %). The results show that the oil obtained from the pomace of the eight grape varieties is similar and presents high content of polyunsaturated fatty acids.

**Uniterms:** grape pomace, seeds, oil, fatty acids.

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país de grande atividade agrícola, com geração de expressivas quantidades de resíduos. Atualmente existe um interesse crescente na exploração dos resíduos gerados pela indústria do vinho (ARVANITOYANNIS, LADAS e MAVROMATIS, 2006). Os subprodutos da vinificação são caracterizados como sendo o bagaço, que consiste principalmente de sementes e cascas de uvas, as grainhas, o folhelho, o engaço, as borras e o sarro (SILVA, 2006).

As sementes representam em torno de 15 % do resíduo sólido produzido e contêm de 14 a 17 % de óleo, dependendo da variedade da uva (GÖKTÜRK BAYDAR e AKKURT, 2001). O principal interesse pelo óleo de semente de uva deve-se a seu alto conteúdo de ácidos graxos insaturados, como o ácido linoléico, (72 a 76 %, m/m), maior que em outros óleos como girassol (60 a 62 %) e soja (50 a 55 %) (CAO e ITO, 2003).

Ácidos graxos poliinsaturados são essenciais para o corpo humano porque não podem ser sintetizados pelo organismo. Dessa forma, o óleo de semente de uva é uma fonte valiosa de gordura dietética. Estudos têm demonstrado que o óleo de semente de uva apresenta diversas atividades farmacológicas, como propriedades contra a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDLs), prevenção de trombose, doenças cardiovasculares, redução do colesterol, dilatação dos vasos sanguíneos, e regulação do sistema nervoso autônomo (CAO e ITO, 2003).

Desde 1930 o óleo de semente de uva vem sendo usado como óleo comestível. Alemanha, França e Itália foram os primeiros países a beneficiarem a semente de uva, enquanto que na América do Sul foram Argentina e Chile. Os maiores produtores mundiais de óleo de semente de uva são Estados Unidos, Espanha e Itália (MIGUEL, 1983). O óleo de semente de uva pode ser usado na produção de ácido linoléico conjugado. Estudos têm demonstrado que esse ácido sintético é um efetivo agente na inibição do câncer de mama, pele e outros em modelos experimentais, devido a sua ação sobre a atividade dos linfócitos (CAO e ITO, 2003).

O objetivo deste trabalho foi determinar o perfil de ácidos graxos presente na fração lipídica do bagaço de oito variedades de uvas tintas (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostras

Foram utilizadas amostras de bagaço de uvas tintas (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.) de oito diferentes variedades: Pinot Noir, Regente, Ancelota, Tannat, Merlot, Bordô, Isabel e Cabernet Sauvignon. As amostras foram coletadas no município de Videira, Santa Catarina, sendo resultantes da safra de 2005/2006, e doadas pela EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina). O município de Videira localiza-se a uma latitude de 27°00', longitude de 51°09', estando a uma altitude de 779,1 m acima do nível do mar, possui clima úmido do tipo temperado, com as estações bem definidas e temperaturas médias que variam de 35 °C no verão a 0 °C no inverno. Com o objetivo de preservar as propriedades gerais dos bagaços, os exemplares foram acondicionados em caixas isotérmicas contendo gelo, sendo encaminhados imediatamente para laboratório, onde foram armazenados à temperatura de  $-18,0 \pm 0,2$  °C e posteriormente analisados.

### 2.2 Métodos

#### 2.2.1 Preparação das amostras e extração da fração lipídica

As amostras de bagaço de uva foram submetidas a tratamento térmico em estufa de ar circulante a 80 °C, por 10 min, para inativação enzimática (TROIANI, TROPIANI e CLEMENTE, 2003). Posteriormente, foram secas em estufa de ar circulante, a 50 °C, por 24 horas. Após resfriamento em dessecador, as amostras foram trituradas em moinho IKA, A11 Basic e tamisadas (*Tamis 60 Mesh*). A fração lipídica foi obtida através do método de FOLCH, LEES e SLOANNE STANLEY (1957).

#### 2.2.2 Esterificação, identificação e quantificação por cromatografia gasosa

A fração lipídica foi submetida à esterificação dos ácidos graxos de acordo com o método descrito por HARTMAN e LAGO (1973). Foi utilizado um cromatógrafo a gás GC 17 A Shimadzu/Class GC 10 com coluna cromatográfica de sílica fundida SP-2560 (biscianopropil polisiloxana) de 100 m e 0.25 mm. de d.i. Condições de análise usadas foram: programação de temperatura da coluna isotérmico a 140 °C por 5 min e então aquecimento a 4 °C/min até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 20 min; temperatura do vaporizador de 250 °C; temperatura de detector de 260 °C; razão de divisão da amostra no injetor = 1/50. Utilizou-se hélio como gás de arraste (1 mL/min). A identificação dos ácidos graxos foi realizada utilizando padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos. A quantificação



foi feita por normalização de área, expressando-se o resultado em percentual de cada ácido sobre o total de ácidos graxos.

### 2.3 Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Realizou-se análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para identificar diferenças significativas entre as médias através do software Statistica® 6.0. O nível de significância considerado para a diferença entre as médias foi de 5 % ( $P < 0,05$ ).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil de ácidos graxos dos bagaços de uva é apresentado na Tabela 8. Os ácidos graxos encontrados em maior abundância foram o linoléico, oléico, palmítico e esteárico. A composição em ácidos graxos do bagaço de uva é similar a de óleos como açafrão, girassol, soja, milho e semente de algodão. Os dados obtidos são inferiores aos encontrados por GÖKTÜRK BAYDAR, ÖZKAN e ÇETIN (2007) que avaliaram bagaços de outras variedades de uva.

Tabela 8. Perfil de Ácidos Graxos (%) da fração lipídica de amostras de bagaço de uva (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.).

Ácidos Graxos	Ancelota	Tannat	Regente	Pinot Noir
C14:0 (Mirístico)	0,11 $\pm$ (0,02) <sup>a</sup>	0,15 $\pm$ (0,00) <sup>b</sup>	0,14 $\pm$ (0,00) <sup>b</sup>	0,18 $\pm$ (0,01) <sup>c</sup>
C16:0 (Palmítico)	6,17 $\pm$ (1,10) <sup>a</sup>	6,62 $\pm$ (0,07) <sup>a,b</sup>	6,91 $\pm$ (0,09) <sup>a,b,c</sup>	7,04 $\pm$ (0,75) <sup>a,b,c</sup>
C16:1 (Palmitoléico)	0,17 $\pm$ (0,03) <sup>a</sup>	0,21 $\pm$ (0,00) <sup>b</sup>	0,22 $\pm$ (0,00) <sup>b,c</sup>	0,34 $\pm$ (0,04) <sup>c</sup>
C18:0 (Esteárico)	3,43 $\pm$ (0,61) <sup>a,b</sup>	4,08 $\pm$ (0,03) <sup>b</sup>	3,51 $\pm$ (0,05) <sup>a,b</sup>	3,05 $\pm$ (0,32) <sup>a</sup>
C18:1 (Elaídico)	0,71 $\pm$ (0,12) <sup>a,b,c</sup>	0,72 $\pm$ (0,01) <sup>a,b,c</sup>	0,73 $\pm$ (0,01) <sup>a,b,c</sup>	0,85 $\pm$ (0,09) <sup>c,d</sup>
C18:1 (Oléico)	9,48 $\pm$ (1,70) <sup>a</sup>	12,53 $\pm$ (0,14) <sup>b</sup>	11,84 $\pm$ (0,16) <sup>b</sup>	13,33 $\pm$ (1,40) <sup>b</sup>
C18:2 (Linoléico)	57,65 $\pm$ (10,27) <sup>a,b</sup>	59,35 $\pm$ (0,66) <sup>a,b</sup>	51,47 $\pm$ (0,86) <sup>a,b</sup>	58,09 $\pm$ (5,90) <sup>a,b</sup>
C20:0 (Araquídico)	0,35 $\pm$ (0,06) <sup>a</sup>	0,37 $\pm$ (0,04) <sup>a</sup>	0,51 $\pm$ (0,01) <sup>c</sup>	0,40 $\pm$ (0,04) <sup>a,b</sup>
C20:1 (Gondóico)	0,16 $\pm$ (0,03) <sup>a</sup>	0,20 $\pm$ (0,02) <sup>a</sup>	0,19 $\pm$ (0,03) <sup>a</sup>	0,20 $\pm$ (0,05) <sup>a</sup>
C18:3 ( $\alpha$ – Linolênico)	1,13 $\pm$ (0,20) <sup>a,b</sup>	0,99 $\pm$ (0,00) <sup>a</sup>	1,26 $\pm$ (0,04) <sup>b,c</sup>	0,94 $\pm$ (0,08) <sup>a</sup>
C22:0 (Beênico)	0,28 $\pm$ (0,05) <sup>a</sup>	0,27 $\pm$ (0,01) <sup>a</sup>	0,60 $\pm$ (0,01) <sup>d</sup>	0,43 $\pm$ (0,03) <sup>b,c</sup>
C24:0 (Lignocérico)	0,26 $\pm$ (0,05) <sup>a,b</sup>	0,20 $\pm$ (0,06) <sup>a</sup>	0,62 $\pm$ (0,06) <sup>c</sup>	0,35 $\pm$ (0,07) <sup>b,c</sup>
C24:1 (Nervônico)	0,22 $\pm$ (0,04) <sup>b</sup>	0,11 $\pm$ (0,00) <sup>a</sup>	0,31 $\pm$ (0,01) <sup>c</sup>	0,22 $\pm$ (0,01) <sup>b</sup>
Totais: Saturados	10,60	11,69	12,29	11,45
Monoinsaturados	10,74	13,77	13,29	14,94
Poliinsaturados	58,78	60,34	52,73	59,03
Insaturados	69,52	74,11	66,02	73,97

Médias de amostras analisadas em triplicata com desvio-padrão entre parêntesis. Médias com letras diferentes na mesma linha significam diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ). nd = não detectado.

*Continuação.* Tabela 8. Perfil de Ácidos Graxos (%) da fração lipídica de amostras de bagaço de uva (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.).

Ácidos Graxos	Bordô	Merlot	Isabel	Cabernet Sauvignon
C14:0 (Mirístico)	0,19 ± (0,00) <sup>c</sup>	nd	0,19 ± (0,01) <sup>c</sup>	0,41 ± (0,01) <sup>d</sup>
C16:0 (Palmítico)	8,24 ± (0,11) <sup>c,d</sup>	6,75 ± (0,14) <sup>a,b</sup>	7,86 ± (0,07) <sup>b,c,d</sup>	8,46 ± (0,01) <sup>d</sup>
C16:1 (Palmitoléico)	0,30 ± (0,01) <sup>d,e</sup>	nd	0,26 ± (0,01) <sup>c,d</sup>	0,57 ± (0,01) <sup>f</sup>
C18:0 (Esteárico)	3,34 ± (0,05) <sup>a</sup>	3,39 ± (0,07) <sup>a,b</sup>	2,89 ± (0,02) <sup>a</sup>	3,43 ± (0,01) <sup>a,b</sup>
C18:1 (Elaídico)	0,91 ± (0,01) <sup>d</sup>	0,69 ± (0,01) <sup>a,b</sup>	0,82 ± (0,01) <sup>b,c,d</sup>	0,64 ± (0,01) <sup>a</sup>
C18:1 (Oléico)	16,81 ± (0,17) <sup>c</sup>	11,36 ± (0,23) <sup>a,b</sup>	13,07 ± (0,08) <sup>b</sup>	11,68 ± (0,04) <sup>a,b</sup>
C18:2 (Linoléico)	57,23 ± (0,66) <sup>a,b</sup>	60,02 ± (1,18) <sup>b</sup>	49,77 ± (0,25) <sup>a,b</sup>	47,63 ± (0,18) <sup>a</sup>
C20:0 (Araquídico)	0,49 ± (0,01) <sup>c</sup>	0,61 ± (0,01) <sup>d</sup>	0,46 ± (0,01) <sup>b,c</sup>	0,39 ± (0,00) <sup>a,b</sup>
C20:1 (Gondóico)	0,21 ± (0,01) <sup>a</sup>	0,17 ± (0,01) <sup>a</sup>	0,15 ± (0,01) <sup>a</sup>	nd
C18:3 ( $\alpha$ – Linolênico)	1,66 ± (0,02) <sup>d</sup>	1,42 ± (0,03) <sup>c</sup>	1,76 ± (0,01) <sup>d</sup>	1,67 ± (0,06) <sup>d</sup>
C22:0 (Beênico)	0,37 ± (0,01) <sup>b</sup>	0,49 ± (0,03) <sup>c</sup>	0,45 ± (0,01) <sup>c</sup>	0,47 ± (0,01) <sup>c</sup>
C24:0 (Lignocérico)	0,24 ± (0,01) <sup>a,b</sup>	0,42 ± (0,02) <sup>c,d</sup>	0,28 ± (0,01) <sup>a,b</sup>	0,52 ± (0,02) <sup>d,e</sup>
C24:1 (Nervônico)	nd	0,22 ± (0,02) <sup>b</sup>	nd	0,32 ± (0,01) <sup>c</sup>
Totais: Saturados	12,87	11,66	12,13	13,68
Monoinsaturados	18,23	12,44	14,30	13,21
Poliinsaturados	58,89	61,44	51,53	49,30
Insaturados	77,12	73,88	65,83	62,51

Médias de amostras analisadas em triplicata com desvio-padrão entre parêntesis. Médias com letras diferentes na mesma linha significam diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ). nd = não detectado.

Os resultados indicaram alto teor do ácido linoléico (47,63 a 60,02 %), sem diferença significativa entre as variedades analisadas ( $P < 0,05$ ), exceto entre as variedades Merlot e Cabernet Sauvignon. CAO e ITO (2003) encontraram valores de ácido linoléico no óleo de semente de uva entre 48 e 57,2 %. GÖKTÜRK BAYDAR e AKKURT (2001) estudando 18 diferentes variedades de uva encontraram teores de ácido linoléico no óleo da semente entre 60,1 e 70,1 %. OHNISHI et al. (1990) obtiveram 69,2 a 80,5 % de ácido linoléico em sementes de cinco diferentes variedades de uva, apresentando valores semelhantes aos encontrados nos bagaços de uva avaliados em nosso trabalho. O ácido oléico mostrou-se em segundo lugar em termos quantitativos nos óleos derivados do bagaço, com valor médio de

12,51 %. Este ácido graxo também apresenta importância em termos nutricionais e na estabilidade oxidativa de óleos (APARÍCIO et al., 1999).

O grau médio de insaturação foi de 70,37 %, atingindo valor máximo de 77,12 % para a variedade Bordô. O grau de insaturação é relativamente alto, porém, inferior aos 86,42 % encontrados por GÖKTÜRK BAYDAR, ÖZKAN e ÇETIN (2007) avaliando bagaços derivados de quatro outras variedades de uva. GÖKTÜRK BAYDAR e AKKURT (2001) também encontraram valores superiores (89,3 %) avaliando apenas as sementes de diferentes variedades de uva. Os altos níveis de insaturação apresentam grande relevância, visto que exibem um importante papel na redução do colesterol sanguíneo e também no tratamento da aterosclerose (AXTELL, 1981).

#### **4 CONCLUSÃO**

As oito variedades de uva apresentam perfil de ácidos graxos similar. O óleo extraído dos bagaços de uvas tintas caracteriza-se por conter alto teor de ácidos graxos poliinsaturados, predominando o ácido linoléico.

#### **AGRADECIMENTOS**

À CAPES e à EPAGRI.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

APARÍCIO, R.; RODA, L.; ALBI, M. A.; GUTIERREZ, F. Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4150-4155, 1999.

ARVANITOYANNIS, I. S.; LADAS, D.; MAVROMATIS, A. Potential uses and applications of treated wine waste: a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 475-487, 2006.

AXTELL, J. D. **Breeding for improvement nutritional quality en Frey**. Plant Breeding II, 497. The Iowa State University Press, Iowa, 1981.

CAO, X.; ITO, Y. Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1021, p. 117-124, 2003.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANNE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipide from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 226, p. 497-509, 1957.

GÖKTÜRK BAYDAR, N.; AKKURT, M. Oil content and oil quality properties of some grape seeds. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 25, p. 163-168, 2001.

GÖKTÜRK BAYDAR, N.; ÖZKAN, G.; ÇETIN, E. S. Characterization of grape seed and pomace oil extracts. **Grasas y aceites**, v. 58, n. 1, p. 29-33, 2007.

HARTMAN, L.; LAGO, B. C. Rapid preparation of fatty methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, p. 475-477, 1973.

MIGUEL, L. **Formulações com óleo de sementes de uva “Suvalan”**. Porto Alegre: Faculdade de Farmácia da UFRGS, 1983.

OHNISHI, M.; HIROSE, S.; KAWAGUCHI, M.; ITO, S.; FUJINO, Y. Chemical Composition of Lipids, Especially Triacylglycerol, in Grape Seeds. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 1035-1042, 1990.

SILVA, L. M. L. R. Caracterização dos Subprodutos da Vinificação. **Revista do ISPV – nº 28**, Out. 2003. Disponível em: <<http://www.ipv.pt/millennium/Millennium28/10.pdf>> (Acesso Out. 2006).

TROIANI, E. P.; TROPIANI, C. T.; CLEMENTE, D. Peroxidase (POD) and Polyphenoloxidase (PPO) in grape (*Vitis vinifera* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 3, p. 635-642, 2003.

## **CAPÍTULO 6**

### **COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE BAGAÇOS DA VINIFICAÇÃO DE UVAS TINTAS (*VITIS VINIFERA* L. E *VITIS LABRUSCA* L.)**

**Artigo submetido à publicação no periódico internacional *International Journal of Food Science and Technology*.**

## COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE BAGAÇOS DA VINIFICAÇÃO DE UVAS TINTAS (*VITIS VINIFERA L.* E *VITIS LABRUSCA L.*)

Ismael I. Rockenbach<sup>1\*</sup>; Eliseu Rodrigues<sup>1</sup>; Luciano V. Gonzaga<sup>1</sup>; Vinícius Caliari<sup>2</sup>;  
Alessandro Lima<sup>3</sup>; Jorge Mancini Filho<sup>3</sup>; Roseane Fett<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Controle de Qualidade de Bebidas e Vinagres, Estação Experimental de Videira, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. – EPAGRI, Videira, SC, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, SP, Brasil.

\*Correspondente: Fone: +55 - 48 - 3721 – 5374.

e-mail: ismael.rockenbach@gmail.com

### RESUMO

O bagaço de uva é caracterizado por altos teores de compostos fenólicos devido à extração insuficiente durante a produção de vinho, o que lhe confere propriedades antioxidantes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante e os principais ácidos fenólicos de bagaços das seguintes variedades de uvas produzidas em Santa Catarina: Cabernet Sauvignon e Merlot (*Vitis vinifera* L.) e Bordô e Isabel (*Vitis labrusca* L.). Aplicaram-se os métodos ABTS, DPPH, FRAP e  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico para avaliar atividade antioxidante e cromatografia gasosa para identificar os ácidos fenólicos. O bagaço da variedade Cabernet Sauvignon apresentou maior atividade antioxidante, exceto no método  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, onde a variedade Bordô mostrou-se superior. Neste método foi observado sinergismo aplicando-se conjuntamente antioxidantes extraídos do bagaço e o sintético BHT. A variedade Bordô apresentou ainda maior concentração de antocianinas monoméricas totais. Foram observados teores expressivos de ácido protocatecuico nas frações de ácidos fenólicos livres e de ácido gálico nas frações de ácidos fenólicos esterificados dos bagaços de uva. Observou-se correlação significativa entre o teor de fenólicos totais e atividade antioxidante, e entre atividade antioxidante e teor de ácidos fenólicos. Assim, os bagaços das variedades Cabernet Sauvignon e Bordô apresentam grande potencial como fonte de compostos antioxidantes e de corantes naturais, respectivamente.

**Palavras-Chave:** Bagaço de uva, compostos fenólicos, atividade antioxidante, ácidos fenólicos, sinergismo.

## ABSTRACT

Grape pomace is characterized by its high contents of phenolic compounds due to an insufficient extraction in wine production, giving to pomace antioxidant properties. The aim of the present work was to evaluate antioxidant activity and determine the main phenolic acids in pomace from the following grape varieties: Cabernet Sauvignon and Merlot (*Vitis vinifera* L.) and Bordô and Isabel (*Vitis labrusca* L.), all produced in Santa Catarina state. The ABTS, DPPH, FRAP and  $\beta$ -carotene/linoleic acid methods were applied in order to evaluate antioxidant activity and gas chromatography to identify phenolic acids. Cabernet Sauvignon pomace presented the highest antioxidant activity with the exception for  $\beta$ -carotene/linoleic acid, where Bordô variety presented higher. In this method a synergism was observed when BHT was applied concomitantly with antioxidants extracted from pomace. Bordô variety presented the highest content of total monomeric anthocyanins. Expressive contents of protocatechuic acid were observed in free phenolic acids fraction and of gallic acid in esterified phenolic acids fraction. A significant correlation was observed between total phenolics content and antioxidant activity and between antioxidant activity and phenolic acids content. So, pomace from Cabernet Sauvignon and Bordô varieties present high potential as a source of antioxidant compounds and natural colorants, respectively.

**Keywords.** Grape pomace, phenolic compounds, antioxidant activity, phenolic acids, synergism.

## 1 INTRODUÇÃO

A associação entre uma dieta rica em frutas e vegetais e a diminuição do risco de doenças cardiovasculares e certas formas de câncer é demonstrada por consideráveis evidências epidemiológicas o que, por hipótese, é devido ao conteúdo de antioxidantes (Goodwin & Brodwick, 1995; Hollman & Katan, 1999; German & Walzem, 2000; Yang *et al.*, 2001; Kaur & Kapoor, 2001; García-Alonso *et al.*, 2004). A ação dos compostos antioxidantes está relacionada à atenuação de eventos oxidativos que podem contribuir para a patofisiologia dessas doenças (Halliwell *et al.*, 1995; Pietta, 2000). Dentre os compostos antioxidantes destacam-se os flavonóides e os ácidos fenólicos nas formas livres ou complexadas. Estes compostos foram identificados e quantificados nas mais diferentes frutas

e vegetais, apresentando alta correlação com a atividade antioxidante demonstrada pelas mesmas (King & Young, 1999; Hollman & Arts, 2000; Soares, 2002; Einbond *et al.*, 2004).

Uvas e vinhos contêm grandes quantidades de compostos fenólicos, principalmente altas concentrações de flavonóides. A maioria dos compostos fenólicos encontrados no vinho pode atuar como antioxidantes (Yildirim *et al.*, 2005). Da mesma forma, os resíduos da produção de vinho também são caracterizados por altos teores de compostos fenólicos devido à extração insuficiente durante a vinificação. Segundo Shrikhande (2000) os extratos de cascas de uva, consistindo de antocianinas das cascas e procianidinas das sementes, são fontes importantes de polifenóis. Sementes e cascas são normalmente descartadas nas operações de suco e vinho branco antes do processamento. Esses resíduos não fermentados tornam-se então valiosos para a extração de polifenóis. Os subprodutos obtidos após exploração da vinificação, tanto as sementes como o bagaço, constituem uma fonte muito barata para a extração de flavonóides antioxidantes, podendo ser utilizados como suplementos alimentares, ou na produção de fitoquímicos, proporcionando vantajosa importância econômica (Alonso *et al.*, 2002; Negro *et al.*, 2003; González-Paramas *et al.*, 2004).

Antioxidantes fenólicos sintéticos tais como BHT (butil hidroxitolueno), BHA (butil hidroxianisol) e TBHQ (terc-butil-hidroxiquinona) inibem efetivamente a oxidação lipídica. No entanto, a preocupação dos consumidores em relação a estes aditivos sintéticos tem motivado a investigação acerca dos benefícios dos antioxidantes naturais como substituintes aos sintéticos (Formanek *et al.*, 2001). Extratos de sementes de uva (0,02 %) foram mais efetivos que alguns antioxidantes naturais como extrato de orégano e oleoresina de alecrim no retardamento do processo de oxidação lipídica em carne cozida refrigerada (Rojas & Brewer, 2007). No entanto, a grande maioria dos trabalhos da literatura avaliou o potencial antioxidante e os compostos fenólicos das partes constituintes do bagaço separadamente, como sementes, cascas e engaço. A proposta deste trabalho foi determinar a atividade antioxidante *in vitro* e alguns dos compostos fenólicos presentes em bagaços de uvas tintas (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.), incluindo cascas, sementes e engaço, visando avaliar o potencial deste subproduto como fonte de antioxidantes e corantes naturais para aplicação em alimentos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes

2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH),  $\beta$ -caroteno, ácido linoléico, BHT (2,6-di-tert-butil-4-metil fenol),



Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico), ácido gálico, cinâmico, *t*-cinâmico, *o*-cumárico, protocatecuico, ferúlico, caféico, quínico, *p*-cumárico, propilgalato, sinápico, elágico, gentísico foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemanha). Reagente Folin-Ciocalteu, 2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) e Tween 40 foram adquiridos da Fluka Chemie AG (Buchs, Suíça). Metanol, hexano, clorofórmio, cloreto férrico, carbonato de sódio, éter etílico, acetona, acetato de etila, tetrahidrofurano, ácido clorídrico, hidróxido de sódio e persulfato de potássio foram adquiridos da Vetec (São Paulo, Brasil).

## 2.2 Amostras

Foram utilizadas amostras de bagaços de uvas tintas das variedades: Cabernet Sauvignon e Merlot (*Vitis vinifera* L.) e Bordô e Isabel (*Vitis labrusca* L.). As amostras foram coletadas na região vinífera de Videira, Santa Catarina, Brasil, sendo resultantes da safra de 2006/2007, e doadas pela EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina). O município de Videira localiza-se a uma latitude de 27°00', longitude de 51°09', estando a uma altitude de 779,1 m acima do nível do mar. Possui clima úmido do tipo temperado, com as estações bem definidas e temperaturas médias que variam de 35 °C no verão a 0 °C no inverno. No transporte até o laboratório, as propriedades gerais dos bagaços foram mantidas pelo acondicionamento dos exemplares em caixas isotérmicas contendo gelo, onde foram armazenados à temperatura de  $-18,0 \pm 0,2$  °C por 14 dias até serem analisados.

## 2.3 Preparo dos extratos

Para obtenção dos extratos, as amostras dos bagaços de uva foram submetidas a tratamento térmico de 80 °C, num período de 10 min, para inativação enzimática (Valderrama *et al.*, 2001; Troiani *et al.*, 2003). Posteriormente, foram secas em estufa de ar circulante à temperatura de 50 °C até peso constante. Após resfriamento em dessecador, as amostras foram trituradas em moinho analítico (IKA modelo A11), peneiradas (*Tamis* 60 mesh) e desengorduradas em extrator Soxhlet, utilizando hexano durante 6 horas. Os extratos foram preparados com 1,00 g de material seco e desengordurado e 50 mL de metanol acidificado (HCl 0,1%) em banho de ultra-som (USC-1400 Unique) pelo tempo de 30 min, à temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C). Os extratos foram filtrados com papel filtro Whatman nº 1. Para a determinação do rendimento dos extratos utilizou-se a metodologia oficial da AOAC, número 967.03.

#### **2.4 Determinação de compostos fenólicos totais**

O conteúdo total de fenólicos em cada extrato foi determinado espectrofotometricamente (espectrofotômetro modelo Hewlett-Packard 8452 A) de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965), com a leitura da absorbância em 765 nm. Os resultados, em peso seco de bagaço, foram expressos em  $\text{mg.g}^{-1}$  equivalente a ácido gálico (GAE).

#### **2.5 Determinação do conteúdo total de antocianinas**

A análise do conteúdo total de antocianinas foi realizada seguindo o método de diferença de pH (Giusti & Wrolstad, 2001). A absorbância foi medida no comprimento de onda de máxima absorção e em 700 nm, sendo o branco feito com água deionizada. Os resultados, em peso seco de bagaço, foram expressos como concentração de pigmentos monoméricos em  $\text{mg.g}^{-1}$  equivalente a malvidina-3-glicosídeo ( $\epsilon = 29500$ ,  $\text{PM} = 562,5$ ).

#### **2.6 Atividade antioxidante - Método ABTS**

O método ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico) foi realizado conforme descrito por Re *et al.* (1999). A absorbância foi medida a 734 nm no tempo de 7 min após a adição do extrato. A atividade antioxidante total do bagaço, em peso seco, foi calculada em  $\mu\text{Mol.g}^{-1}$  de TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox) (Rice-Evans *et al.*, 1996).

#### **2.7 Atividade antioxidante - Método DPPH**

O método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi aplicado com modificações descritas por Kim *et al.* (2002). Avaliou-se a redução da absorbância do radical DPPH $\bullet$  100  $\mu\text{M}$  (2,9 mL) dissolvido em metanol a 80% no comprimento de onda de 515 nm após 30 min da adição de cada extrato. A atividade antioxidante total do bagaço, em peso seco, foi calculada em  $\mu\text{Mol.g}^{-1}$  de TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

#### **2.8 Poder Redutor - Método FRAP**

Descrito por Benzie & Strain (1996), com modificações de Arnous *et al.* (2002), o método é baseado na medida direta da habilidade dos antioxidantes (redutores) da amostra em reduzirem em meio ácido (pH 3,6) o complexo  $\text{Fe}^{3+}$ /tripiridiltriazina (TPTZ) para formar  $\text{Fe}^{2+}$ , de intensa cor azul. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 620 nm. O valor

do poder redutor, em peso seco de bagaço, foi expresso em  $\mu\text{Mol.g}^{-1}$  de TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

### 2.9 Poder de inibição da oxidação - Método de co-oxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoléico

O poder de inibição da oxidação foi avaliado pelo método de descoloramento do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico descrito por Marco (1968) e modificado por Miller (1971). Uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  da solução de  $\beta$ -caroteno (20  $\text{mg.mL}^{-1}$  em clorofórmio) foi colocada em um frasco erlenmeyer de 250 mL com 40  $\mu\text{L}$  de ácido linoléico, 1 mL de clorofórmio e 20 mg de Tween 40. Após homogeneização o clorofórmio foi completamente evaporado com nitrogênio. Adicionou-se água deionizada (previamente submetida a tratamento com atmosfera de oxigênio durante 30 min) até a formação de uma emulsão límpida e com absorvância entre 0,6 e 0,7 a 470 nm. Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  dos extratos e do antioxidante sintético BHT (butil hidroxitolueno) na concentração de 100  $\text{mg.L}^{-1}$  foram adicionadas a 5 mL da emulsão em cubetas de vidro (10 mm de caminho óptico). Após a leitura inicial, a absorvância foi monitorada a cada 15 min, durante 2 horas, sendo as cubetas mantidas em banho-maria a 50 °C. A redução da absorvância foi comparada ao controle (sem antioxidante). Além disso, o efeito sinérgico foi avaliado a partir de 100  $\mu\text{L}$  de misturas a 100  $\text{mg.L}^{-1}$  dos extratos com a solução de BHT na razão 1:1. A atividade antioxidante foi calculada em termos de percentual de inibição, relativo ao controle, de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left( \frac{A_i - A_f}{C_i - C_f} \times 100 \right)$$

$A_i$  = absorvância inicial da solução de extrato

$A_f$  = absorvância final da solução de extrato

$C_i$  = absorvância inicial da solução controle

$C_f$  = absorvância final da solução controle

### 2.10 Extração dos ácidos fenólicos

Para a extração dos ácidos fenólicos seguiu-se metodologia descrita por Krygier *et al.* (1982), com algumas modificações, obtendo-se de forma seqüencial as frações de ácidos fenólicos livres (AFL), ácidos fenólicos esterificados (AFES) e ácidos fenólicos insolúveis (AFI), conforme descrito a seguir:

### Ácidos fenólicos livres (AFL)

Pesou-se 1 g da amostra seca e desengordurada e extraiu-se com solvente tetrahydrofurano (THF) (6 x 20 mL). Cada extrato foi centrifugado a 3000 x g e o sobrenadante filtrado com papel filtro Whatman nº 1 sob sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado em rota-evaporador e a fração AFL ressuspensa em 5 mL de metanol.

### Ácidos fenólicos esterificados (AFES)

A amostra, após extração com THF na etapa anterior, foi extraída (6 x 20 mL) com metanol/acetona/água (7:7:6). Após centrifugação de cada extrato a 3000 x g, o sobrenadante era filtrado e desidratado com sulfato de sódio anidro, e evaporado em rota-evaporador até a fase aquosa. Com o objetivo de liberar estereis solúveis esterificados com proteínas ou polipeptídios adicionou-se à fase aquosa o mesmo volume de NaOH (4 M) para propiciar a hidrólise destas interações. A hidrólise foi conduzida durante 4 h, sob agitação, à temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C) e protegida da luz. Após ajuste do pH para 2 ( $\pm 0,1$ ) com HCl (6 M), procedeu-se lavagem (5 x) com volume igual de hexano para eliminação de ácidos graxos livres e/ou outros contaminantes (glicosídeos). Realizou-se nova extração (6 x) com igual volume da mistura éter etílico/acetato de etila/THF (1:1:1). A fase da mistura éter etílico/acetato de etila/THF (1:1:1), filtrada e desidratada com sulfato de sódio anidro, foi evaporada em rota-evaporador e a fração AFES ressuspensa em 5 mL de metanol.

### Ácidos fenólicos insolúveis (AFI)

A amostra, após extração com metanol/acetona/água (7:7:6) na etapa anterior, foi hidrolisada com 15 mL de NaOH (4 M) durante 4h, à temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C) e protegida da luz. O ajuste do pH e as etapas seguintes para obtenção da fração AFI foram iguais as da fração AFES descritas anteriormente.

## 2.11 Derivatização dos ácidos fenólicos

Alíquotas de 0,5 mL das frações de ácidos fenólicos obtidas foram transferidas para *vials* contendo 0,1 mL de padrão interno (éster metila de ácido heptadecanóico) e o metanol foi evaporado com nitrogênio gasoso. Realizou-se então o processo de derivatização pela adição de BSA (*N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida) (0,2 mL). Este processo de derivatização fez-se necessário a fim de esterificar os ácidos fenólicos para uma melhor separação por cromatografia gasosa. Para a completa derivatização, a solução foi incubada a 60 °C por 30 min, obtendo-se as amostras prontas para serem injetadas no cromatógrafo.

## 2.12 Identificação e quantificação dos ácidos fenólicos

A identificação dos ácidos fenólicos foi realizada em cromatógrafo a gás marca Shimadzu, modelo 17 A, equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar DB-5 (J&W) de 30 m de comprimento por 0,25 mm de diâmetro interno. Foi utilizada mistura de padrões de ácidos fenólicos para identificar os ácidos fenólicos nas diferentes frações, pelos respectivos tempos de retenção. O hélio foi utilizado como gás de arraste a uma razão de fluxo de 3 mL.min<sup>-1</sup>. As condições cromatográficas seguiram os procedimentos descritos por Moreira & Mancini Filho (2003): temperatura inicial da coluna a 150 °C, isotérmica por três minutos; de 150 °C para 300 °C, aumentando 5 °C.min<sup>-1</sup>; isotérmica a 300 °C por três min. A temperatura da câmara de injeção foi de 250 °C e a do detector foi de 300 °C.

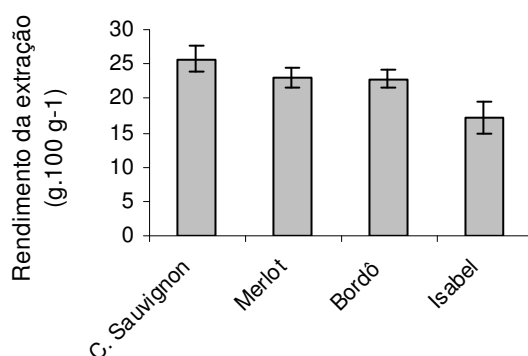
## 2.13 Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada pela aplicação da ANOVA e o teste Tukey visando identificar diferenças significativas entre as médias, usando o software Statistica<sup>®</sup> versão 6.0. O nível de significância considerado para a diferença entre as médias foi de 5 % (P<0,05). Foram analisadas três amostras de bagaço (n = 3) de cada variedade de uva, sendo todas as análises executadas em triplicata.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Rendimento e compostos fenólicos totais

O rendimento obtido nas extrações dos bagaços de uva é apresentado na **Figura 9**, e como pode ser observado, o extrato da variedade Cabernet Sauvignon apresentou maior conteúdo de sólidos solúveis (P<0,05). Não houve diferença significativa (P<0,05) entre o conteúdo extraído nos extratos das variedades Merlot e Bordô.



**Figura 9.** Rendimento de extratos de bagaço de uva (média e intervalo de confiança, P<0,05).

O conteúdo total de compostos fenólicos nos extratos apresentou diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as variedades avaliadas (**Tabela 9**), o que é esperado, visto que a concentração de fenólicos nas uvas depende do tipo de vinificação e de diversos fatores genéticos, ambientais e culturais (Doshi *et al.*, 2006). O extrato da variedade Cabernet Sauvignon apresentou maior conteúdo de fenólicos totais, sendo mais de duas vezes superior ao conteúdo observado no extrato da variedade Isabel. A variedade Cabernet Sauvignon também apresentou teor maior de compostos fenólicos totais que as variedades Pinot Noir ( $73,66 \text{ mg.g}^{-1}$ ) e Regente ( $49,73 \text{ mg.g}^{-1}$ ), produzidas também na região de Videira, Santa Catarina, e avaliadas por nós em estudo anterior (Rockenbach *et al.*, 2007).

**Tabela 9.** Conteúdo de Fenólicos Totais (FT), Antocianinas Monoméricas Totais (AMT), Atividade Antioxidante (ABTS e DPPH) e Poder Redutor (FRAP) de extratos de bagaços de uvas tintas (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.).

Variedade	FT <sup>1</sup> ( $\text{mg.g}^{-1}$ )	AMT <sup>2</sup> ( $\text{mg.g}^{-1}$ )	ABTS <sup>3</sup> ( $\mu\text{Mol.g}^{-1}$ )	DPPH <sup>3</sup> ( $\mu\text{Mol.g}^{-1}$ )	FRAP <sup>3</sup> ( $\mu\text{Mol.g}^{-1}$ )
Cabernet Sauvignon	$74,75 \pm 2,22 \text{ a}$	$3,51 \pm 0,16 \text{ b}$	$485,42 \pm 3,72 \text{ a}$	$505,52 \pm 4,62 \text{ a}$	$249,46 \pm 1,92 \text{ a}$
Merlot	$46,23 \pm 1,63 \text{ c}$	$1,97 \pm 0,07 \text{ c}$	$318,16 \pm 1,90 \text{ c}$	$328,39 \pm 3,15 \text{ c}$	$169,19 \pm 0,62 \text{ c}$
Bordô	$63,31 \pm 2,40 \text{ b}$	$5,61 \pm 0,25 \text{ a}$	$355,06 \pm 2,35 \text{ b}$	$361,12 \pm 2,89 \text{ b}$	$208,43 \pm 2,20 \text{ b}$
Isabel	$32,62 \pm 0,68 \text{ d}$	$0,92 \pm 0,03 \text{ d}$	$193,36 \pm 2,14 \text{ d}$	$188,02 \pm 2,50 \text{ d}$	$117,79 \pm 1,33 \text{ d}$

Valores em base seca de bagaço de uva expressos como média  $\pm$  desvio-padrão,  $n = 3$ .

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

<sup>1</sup> Expresso em  $\text{mg GAE.g}^{-1}$  (equivalente a ácido gálico).

<sup>2</sup> Expresso em equivalente a malvidina-3-glicosídeo.

<sup>3</sup> Expresso em  $\mu\text{Mol.g}^{-1}$  de TEAC (Atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

Sánchez-Alonso *et al.* (2008), avaliando o conteúdo de polifenóis totais extraído da fibra dietética obtida a partir de bagaço de uva da variedade Airén, produzida na Espanha, encontraram  $78,5 \text{ mg.g}^{-1}$ . Esse teor é superior aos teores observados em nosso estudo, com pequena diferença no caso da variedade Cabernet Sauvignon. Na Turquia, Bozan *et al.* (2008) encontraram  $103,7$  e  $105,7 \text{ mg.g}^{-1}$  de compostos fenólicos totais em sementes de uvas das variedades Cabernet Sauvignon e Merlot, respectivamente. Em outro estudo recente de Yemis *et al.* (2008) com sementes de uvas cultivadas também na Turquia, foram obtidos valores médios de fenólicos totais, em peso seco, de  $49,31 \text{ mg.g}^{-1}$  para cinco diferentes variedades de uvas brancas, e de  $50,41 \text{ mg.g}^{-1}$  para sete diferentes variedades de uvas tintas. Estes teores em sementes de uvas são superiores aos teores de fenólicos totais nos bagaços das variedades Merlot e Isabel, mas não superam o conteúdo fenólico observado nos bagaços das variedades Cabernet Sauvignon e Bordô. Portanto, o conjunto das partes que formam o bagaço da vinificação de uvas pode ser considerado, assim como as sementes, uma fonte importante de

polifenóis e, dependendo da finalidade de sua utilização, podem ser dispensadas etapas preliminares de separação das partes constituintes do bagaço.

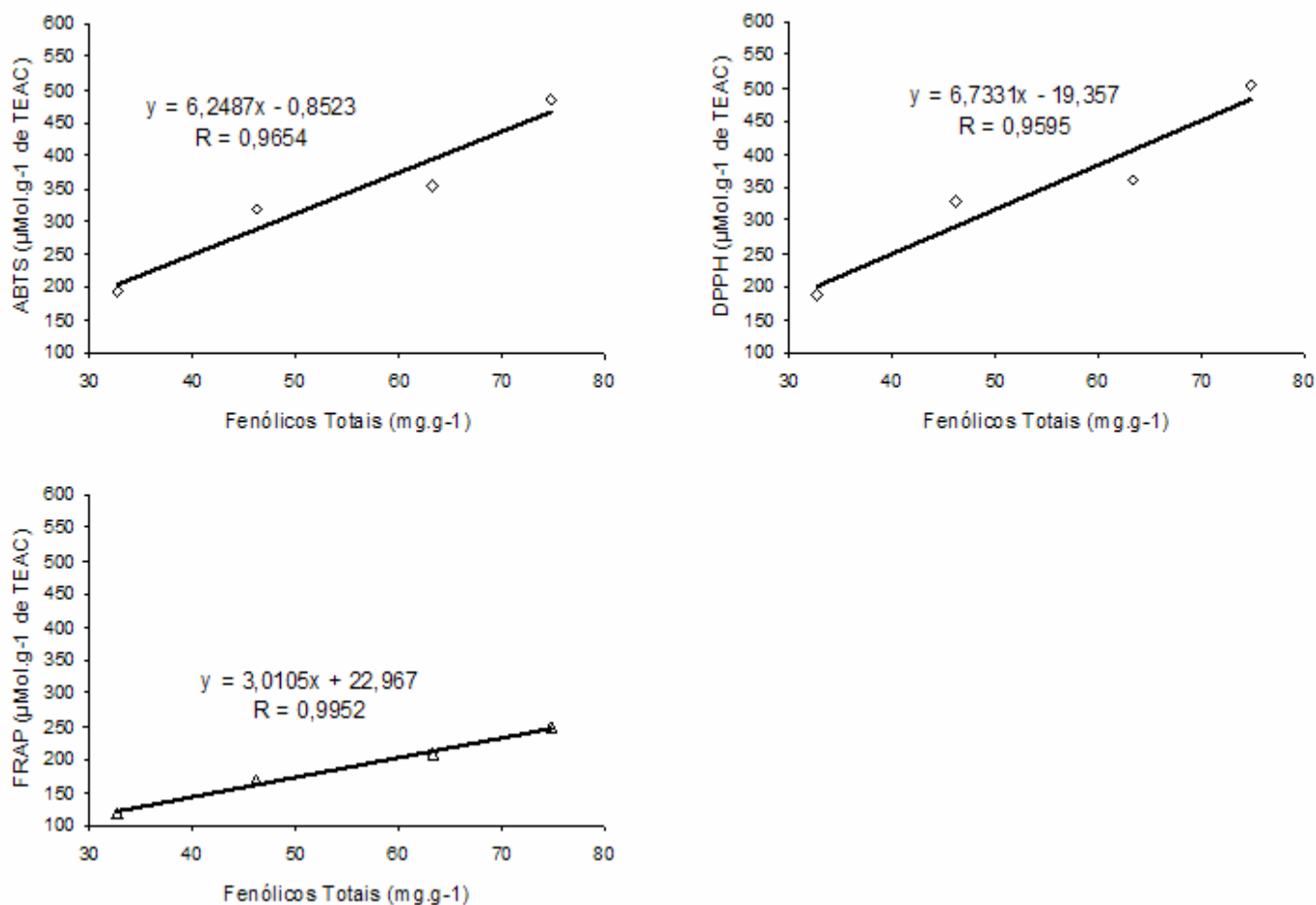
### 3.2 Antocianinas Monoméricas Totais

Na **Tabela 9** também são apresentados os conteúdos de antocianinas monoméricas totais dos extratos avaliados. Foram observadas diferenças significativas entre os extratos ( $P < 0,05$ ) e, diferentemente do conteúdo de fenólicos totais, o bagaço da variedade Bordô apresentou maior teor de antocianinas, sendo cinco vezes superior ao da variedade Isabel. O bagaço da variedade Bordô também apresentou maior teor de antocianinas na comparação com uvas da variedade Sharad Seedless cultivadas na Índia, que apresentaram  $3,9 \text{ mg.g}^{-1}$  de antocianinas monoméricas totais, em peso de baga fresca, no fim do estágio de maturação e desenvolvimento completo dos pigmentos (Doshi *et al.*, 2006). Em outro estudo que avaliou bagaços de uvas de diferentes variedades produzidas na Itália (Ruberto *et al.*, 2007), foram extraídos conteúdos de  $3,75$  a  $45,27 \text{ mg.g}^{-1}$  de antocianinas totais. Considerando-se que o bagaço de uva pode ser utilizado como uma fonte para a extração de corantes naturais, o bagaço da variedade Bordô apresenta maior potencial para esta finalidade entre as variedades avaliadas em nosso estudo.

Os coeficientes de correlação entre o teor de antocianinas monoméricas totais e a atividade antioxidante dos bagaços pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP ( $R = 0,6002$ ,  $0,5869$  e  $0,7283$ , respectivamente) são menores que os coeficientes obtidos entre o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante (apresentados mais adiante). Isto ocorre porque as antocianinas representam apenas um dos grupos de compostos que formam o conjunto de fenólicos totais dos bagaços de uva. Já o coeficiente de correlação entre o conteúdo total de antocianinas e o poder dos extratos de inibir a oxidação no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico ( $R = 0,8867$ ) foi maior que o coeficiente de correlação entre o poder de inibição e o conteúdo de fenólicos totais dos extratos ( $R = 0,7868$ ).

### 3.3 Atividade antioxidante e Poder redutor

A determinação da atividade antioxidante dos extratos foi realizada pelos métodos ABTS e DPPH e o poder redutor pelo método FRAP (**Tabela 9**). A partir dos dados obtidos observa-se forte relação positiva entre o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante medida; e entre o teor de fenólicos e o poder redutor. Os coeficientes de correlação (**Figura 10**) foram significativos ( $P < 0,05$ ), sendo a maior correlação obtida entre o conteúdo de fenólicos totais e o poder redutor ( $R = 0,9952$ ).



**Figura 10.** Correlação entre o conteúdo total de fenólicos e atividade antioxidante pelo método ABTS e pelo método DPPH e entre o conteúdo total de fenólicos e o poder redutor pelo método FRAP.

A variedade Cabernet Sauvignon apresentou maior atividade antioxidante (485,42 e 505,52  $\mu\text{Mol TEAC.g}^{-1}$  pelos métodos ABTS e DPPH, respectivamente) e maior poder redutor (249,46  $\mu\text{Mol TEAC.g}^{-1}$  pelo método FRAP) em relação às demais variedades avaliadas. Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as diferentes variedades. Em nosso estudo anterior com bagaços de uvas tintas das variedades Regente e Pinot Noir (Rockenbach *et al.*, 2007), foram obtidos, respectivamente, valores médios de 419 e 477  $\mu\text{Mol TEAC.g}^{-1}$  pelo método ABTS e 479 e 480  $\mu\text{Mol TEAC.g}^{-1}$  pelo método DPPH. Em outro estudo recente de Pérez-Jiménez *et al.* (2008), bagaços de uvas tintas produzidas na região de Manzanares, na Espanha, apresentaram atividade antioxidante menor, de 124,4  $\mu\text{Mol TEAC.g}^{-1}$  pelo método ABTS, em relação aos dados obtidos em nosso estudo; e poder redutor maior, de 273,9  $\mu\text{Mol TEAC.g}^{-1}$  pelo método FRAP, o qual é atribuído aos potenciais redox dos compostos fenólicos individuais e suas propriedades estruturais, como o grau de hidroxilação

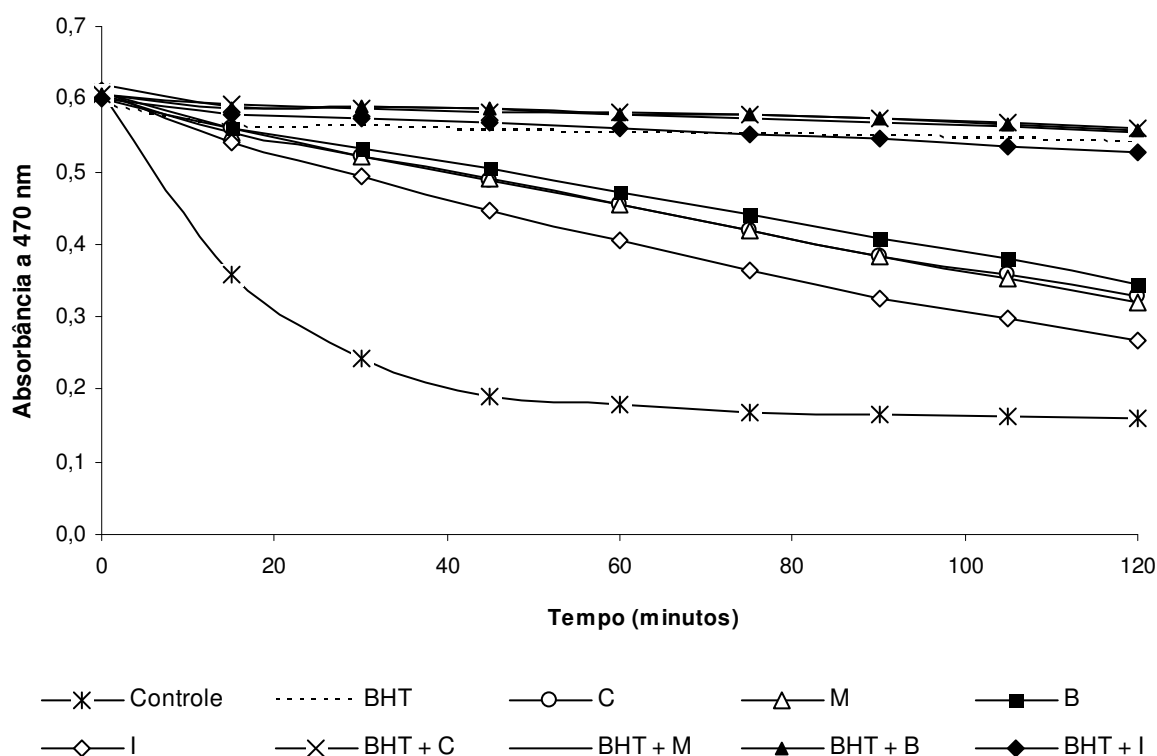


e a extensão das suas conjugações (Pulido *et al.*, 2000). No estudo de Sánchez-Alonso *et al.* (2008) a fibra dietética obtida a partir de bagaço de uva da variedade Airén, produzida na Espanha, apresentou atividade antioxidante de 284  $\mu\text{Mol TEAC.g}^{-1}$  pelo método ABTS, valor inferior em relação à atividade observada em nosso estudo para a maioria das variedades.

### 3.4 Poder de inibição da oxidação

Além de apresentarem boa atividade antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH, e significativo poder redutor pelo método FRAP, os extratos de bagaço de uva apresentaram capacidade de inibir a oxidação no ensaio do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, como pode ser observado na **Figura 11**. Este método avalia o mecanismo de descolorimento do  $\beta$ -caroteno em um fenômeno mediado por radicais livres formados a partir do ácido linoléico. A presença de extratos com atividade antioxidante pode inibir a extensão da perda de cor do  $\beta$ -caroteno pela neutralização dos radicais livres formados no sistema, sendo dose-dependente o percentual de inibição da oxidação.

As quedas de absorvância nos sistemas adicionados dos extratos de bagaço de uva foram, em ordem decrescente: Isabel > Merlot > Cabernet Sauvignon > Bordô, com percentuais finais de inibição da oxidação de 21,46; 34,38; 35,56 e 41,13 %, respectivamente. A associação entre o antioxidante sintético BHT (butil hidroxitolueno) e os extratos de bagaço de uva apresentou efeito sinérgico na inibição do processo de oxidação, com percentuais de inibição maiores no caso das variedades Bordô (88,83 %), Cabernet Sauvignon (89,29 %) e Merlot (88,37 %) em comparação ao percentual de inibição obtido com a aplicação do BHT puro (87,23 %). No estudo de Jardini & Mancini Filho (2007) também foi observado efeito sinérgico na aplicação conjunta de BHT e extratos de polpa e semente de romã. Esses dados são interessantes à medida que comprovam a capacidade de extratos naturais de atuarem em sinérgismo com aditivos sintéticos, como o BHT, viabilizando sua utilização em substituição parcial aos antioxidantes sintéticos comercialmente utilizados. Assim, os resultados obtidos sugerem significativo poder dos extratos de bagaços de uvas em inibir os processos oxidativos em meio emulsionado, apresentando sinérgismo ao atuarem na presença de BHT.



**Figura 11.** Poder de inibição da oxidação de extratos de bagaço de uva e BHT (butil hidroxitolueno) a 100 ppm pelo sistema de co-oxidação de substratos  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. C = Cabernet Sauvignon; M = Merlot; B = Bordô; I = Isabel.

### 3.5 Ácidos fenólicos

As concentrações dos ácidos fenólicos identificados nas frações dos bagaços de uva são apresentadas na **Tabela 10**. A variedade Cabernet Sauvignon apresentou maior teor total de ácidos fenólicos nos bagaços ( $6,05 \text{ mg.g}^{-1}$ ), seguida pelas variedades Bordô ( $4,69 \text{ mg.g}^{-1}$ ), Merlot ( $3,36 \text{ mg.g}^{-1}$ ) e Isabel ( $2,89 \text{ mg.g}^{-1}$ ). O ácido gálico, que possui três grupos hidroxila ligados ao anel aromático, foi identificado em concentrações expressivas nas frações AFES, principalmente na variedade Cabernet Sauvignon, com  $2,19 \text{ mg.g}^{-1}$ . Em relação ao ácido protocatecuico, este foi encontrado em concentrações expressivas principalmente nas frações AFL das amostras, como na variedade Bordô, com  $2,01 \text{ mg.g}^{-1}$ . Sroka & Cisowski (2003) demonstraram que a atividade antioxidante e anti-radical dos ácidos fenólicos está correlacionada positivamente com o número de grupos hidroxila ligados ao anel aromático. Esses autores observaram maior atividade antioxidante e anti-radical para o ácido gálico (três grupos hidroxila ligados ao anel aromático), seguido pelo ácido protocatecuico (dois grupos hidroxila ligados ao anel aromático).

Bonilla *et al.* (1999) também observaram maior atividade antioxidante do ácido gálico, seguido pelo ácido protocatecuico no ensaio do tempo de indução da oxidação em óleo de

oliva. Esses autores testaram também antioxidantes sintéticos, sendo estes mais eficientes na comparação com antioxidantes naturais testados nas mesmas concentrações. No entanto, de acordo com os mesmos, os fenólicos obtidos de fontes naturais, para terem sua eficácia aumentada, podem ser adicionados em maior concentração em relação aos sintéticos, que possuem limite de adição estabelecido na legislação.

**Tabela 10.** Concentrações de ácidos fenólicos (mg.g<sup>-1</sup>) de bagaços de uvas tintas das variedades C. Sauvignon, Merlot, Bordô e Isabel.

C. Sauvignon	AFL	AFES	AFI	Merlot	AFL	AFES	AFI
Cinâmico	nd	nd	nd	Cinâmico	0,11 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,00
<i>t</i> -cinâmico	nd	nd	nd	<i>t</i> -cinâmico	0,05 ± 0,00	nd	nd
<i>o</i> -cumárico	0,40 ± 0,01	nd	nd	<i>o</i> -cumárico	0,07 ± 0,00	nd	nd
Protocatecuico	1,33 ± 0,29	0,26 ± 0,03	0,09 ± 0,00	Protocatecuico	1,43 ± 0,04	nd	0,11 ± 0,01
Ferúlico	nd	nd	nd	Ferúlico	0,05 ± 0,01	nd	nd
Caféico	nd	nd	nd	Caféico	0,05 ± 0,00	nd	nd
Quínico	0,05 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,14 ± 0,00	Quínico	nd	0,13 ± 0,01	0,16 ± 0,01
<i>p</i> -cumárico	nd	0,11 ± 0,00	0,09 ± 0,00	<i>p</i> -cumárico	nd	nd	0,03 ± 0,01
Gálico	nd	2,19 ± 0,08	0,32 ± 0,02	Gálico	nd	0,49 ± 0,05	0,35 ± 0,06
Propilgalato	0,21 ± 0,01	nd	nd	Propilgalato	nd	nd	nd
Sinápico	nd	nd	nd	Sinápico	nd	nd	nd
Elágico	0,46 ± 0,01	nd	nd	Elágico	nd	nd	nd
Gentísico	0,15 ± 0,02	nd	nd	Gentísico	nd	0,08 ± 0,01	nd

Bordô	AFL	AFES	AFI	Isabel	AFL	AFES	AFI
Cinâmico	0,11 ± 0,03	nd	nd	Cinâmico	nd	nd	nd
<i>t</i> -cinâmico	nd	nd	nd	<i>t</i> -cinâmico	nd	nd	nd
<i>o</i> -cumárico	0,15 ± 0,03	nd	nd	<i>o</i> -cumárico	nd	nd	nd
Protocatecuico	2,01 ± 0,24	nd	0,07 ± 0,02	Protocatecuico	0,73 ± 0,03	nd	0,16 ± 0,00
Ferúlico	nd	nd	nd	Ferúlico	nd	nd	nd
Caféico	nd	0,22 ± 0,02	0,20 ± 0,02	Caféico	nd	nd	0,11 ± 0,00
Quínico	0,14 ± 0,03	0,16 ± 0,02	0,14 ± 0,01	Quínico	0,10 ± 0,00	nd	0,15 ± 0,01
<i>p</i> -cumárico	0,04 ± 0,02	0,16 ± 0,55	0,19 ± 0,04	<i>p</i> -cumárico	nd	0,11 ± 0,02	0,28 ± 0,06
Gálico	0,19 ± 0,02	0,59 ± 0,04	0,26 ± 0,01	Gálico	0,13 ± 0,01	0,55 ± 0,11	0,39 ± 0,00
Propilgalato	nd	nd	nd	Propilgalato	0,11 ± 0,01	nd	nd
Sinápico	nd	nd	nd	Sinápico	0,07 ± 0,03	nd	nd
Elágico	nd	nd	nd	Elágico	nd	nd	nd
Gentísico	nd	0,06 ± 0,01	nd	Gentísico	nd	nd	nd

Valores em base seca de bagaço de uva expressos como média ± desvio-padrão, n = 3.

AFL = ácidos fenólicos livres; AFES = ácidos fenólicos esterificados; AFI = ácidos fenólicos insolúveis.

nd = não detectado.

A análise dos dados permite verificar que os coeficientes de correlação obtidos entre a atividade antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH e o conteúdo total de ácidos fenólicos dos bagaços das diferentes variedades de uva ( $R = 0,9495$  e  $0,9424$ , respectivamente), e entre o poder redutor pelo método FRAP e o conteúdo total de ácidos fenólicos ( $R = 0,9667$ ), foram

significativos ( $P < 0,05$ ). Esses resultados confirmam a forte relação entre a presença desses compostos nos bagaços de uva e a atividade antioxidante total apresentada pelos mesmos. No entanto, os ácidos fenólicos não são os únicos compostos fenólicos com capacidade de atuarem como antioxidantes nos bagaços de uva. Outros componentes, como flavonóides não-antociânicos e proantocianidinas, podem ter contribuído significativamente, principalmente na capacidade dos extratos de bagaço de uva de atuarem na inibição do processo oxidativo induzido do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, o que pode ser inferido, uma vez que a correlação apresentada entre o conteúdo total de ácidos fenólicos e o percentual de inibição dos diferentes extratos nesse sistema foi menor ( $R = 0,6378$ ), porém significativa ( $P < 0,05$ ).

#### 4 CONCLUSÃO

Os bagaços de uva avaliados apresentaram elevados teores de fenólicos totais, ácidos fenólicos e atividade antioxidante, estando estes teores significativamente correlacionados ( $P < 0,05$ ). As variedades Cabernet Sauvignon e Bordô apresentaram, respectivamente, maior potencial para a extração de antioxidantes e de corantes naturais. O efeito sinérgico observado na aplicação conjunta dos extratos de bagaço de uva e BHT na inibição do processo oxidativo em meio emulsionado é um indicativo da viabilidade da utilização em alimentos desses extratos em substituição parcial aos antioxidantes sintéticos comercialmente utilizados.

#### AGRADECIMENTOS

À CNPq/Capes pelo auxílio financeiro, e à EPAGRI (Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária) de Videira, Estado de Santa Catarina, pelo fornecimento das amostras.

#### REFERÊNCIAS

- Alonso, A.M., Guillén, D.A., Barroso, C.G., Puertas, B. & García, A. (2002). Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 5832-5836.
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists. (1990). *Moisture in peat*. Official Methods of Analysis, 15th ed.; AOAC: Champaign, IL; Method 967.03.

- Arnous, A., Makris, D. & Kefalas, P. (2002). Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *Journal of Food Composition and Analysis*, **15**, 655-665.
- Benzie, I.F.F. & Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, **239**, 70-76.
- Bonilla, F., Mayen, M., Merida, J. & Medina, M. (1999). Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chemistry*, **66**, 209-215.
- Bozan, B., Tosun, G. & Özcan, D. (2008). Study of polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antiradical activity. *Food Chemistry*, **109**, 426-430.
- Doshi, P., Adsule, P. & Banerjee, K. (2006). Phenolic composition and antioxidant activity in grapevine parts and berries (*Vitis vinifera* L.) cv. Kishmish Chorneyi (Sharad Seedless) during maturation. *International Journal of Food Science and Technology*, **41**, 1-9.
- Einbond, L.S., Reynertson, K.A., Luo, X-D., Basile, M.J. & Kennelly, E.J. (2004). Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry*, **84**, 23-28.
- Formanek, Z., Kerry, J.P., Higgins, F.M., Buckley, D.J., Morrissey, P.A. & Farkas, J. (2001). Addition of synthetic and natural antioxidants tocopheryl acetate supplemented beef patties: effects of antioxidants and packaging on lipid oxidation. *Meat Science*, **58**, 337-341.
- García-Alonso, M., Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C. & Rivas-Gonzalo, J.C. (2004). Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chemistry*, **84**, 13-18.
- German, J.B. & Walzem, R.L. (2000). The health benefits of wine. *Annual Review of Nutrition*, **20**, 561-593.
- Giusti, M.M. & Wrolstad, R.E. (2001). Anthocyanins. Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. In: Wrolstad, R. E. (Ed.) *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: John Wiley & Sons. Unit. F1.2.1-13.
- Goodwin, J.S. & Brodwick, M. (1995). Diet, aging, and cancer. *Clinical Geriatric Medical*, **11**, 4, 577-589.
- González-Paramás, A.M., Esteban-Ruano, S., Santos-Buelga, C., Pascual-Teresa, S. & Rivas-Gonzalo, J. (2004). Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 234-238.
- Halliwell, B., Aeschbacht, R., Lorigert, J. & Aruoma, O.I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food Chemistry and Toxicology*, **33**, 7, 601-617.
- Holmman, P.C.H. & Arts, I.C.W. (2000). Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of Science of Food and Agriculture*, **80**, 1081-1093.

- Hollman, P.C.H. & Katan, M.B. (1999). Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*, **37**, 937–942.
- Jardini, F.A. & Mancini Filho, J. (2007). Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes de romã (*Punica granatum*, L.). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **43**, 1, 137-147.
- Kaur, C. & Kapoor, H.C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. *International Journal of Food Science & Technology*, **36**, 7, 703-725.
- Kim, D-O., Lee, K.W., Lee, H.J. & Lee, C.Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 3713-3717.
- King, A. & Young, G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolics phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, **99**, 2, 213-218.
- Krygier, K., Sosulski, F. & Hogge, L. (1982). Free, esterified and insoluble-bound phenolic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **30**, 334-336.
- Lu, Y. & Foo, L.Y. (1999). The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chemistry*, **65**, 1-8.
- Marco, G.J. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, **45**, 594-598.
- Miller, H.E. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, **48**, 91.
- Moreira, A.V.B. & Mancini Filho, J. (2003). Atividade antioxidante das especiarias mostarda canela e erva-doce em sistemas aquoso e lipídico. *Nutrire*, **25**, 31-46.
- Naczki, M. & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**, 1523-1542.
- Negro, C., Tommasi, L. & Miceli, A. (2003). Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology*, **87**, 41-44.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Rubio, M.E.D., Serrano, J., Goñi, I. & Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, **41**, 274-285.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, **63**, 1035-1042.

- Pulido, R., Bravo, L. & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenolics as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 3396-3402.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, **26**, 1231-1237.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. & Paganga, G. (1996). Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, **20**, 933-956.
- Rockenbach, I.I., Silva, G.L., Rodrigues, E., Gonzaga, L.V. & Fett, R. (2007). Atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva das variedades Regente e Pinot Noir (*Vitis vinifera*). *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, **66**, 2, 158-163.
- Rojas, M.C. & Brewer, M.S. (2007). Effect of natural antioxidants on oxidative stability of cooked, refrigerated beef and pork. *Journal of Food Science*, **72**, 4, 282-288.
- Ruberto, G., Renda, A., Daquino, C., Amico, V., Spatafora, C., Tringali, C. & Tommasi, N. (2007). Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chemistry*, **100**, 203-210.
- Sánchez-Alonso, I., Jiménez-Escrig, A., Saura-Calixto, F. & Borderías, A.J. (2008). Antioxidant protection of white grape pomace on restructured fish products during frozen storage. *LWT – Food Science and Technology*, **41**, 42-50.
- Shrikhande, A.J. (2000). Wine by-products with health benefits. *Food Research International*, **33**, 469-474.
- Singleton, V.L. & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**, 144-158.
- Soares, S.E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, **15**, 1, 71-81.
- Sroka, Z. & Cisowski, W. (2003). Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*, **41**, 753-758.
- Troiani, E.P., Tropiani, C.T. & Clemente, D. (2003). Peroxidase (POD) and Polyphenoloxidase (PPO) in grape (*Vitis Vinifera* L.). *Ciência e Agrotecnologia*, **27**, 3, 635-642.
- Valderrama, P., Marangoni, F. & Clemente, E. (2001). Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **21**, 321-325.

- Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M. & Newmark, H. (2001). L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, **21**, 381-406.
- Yemis, O., Bakkalbasi, E. & Artik, N. (2008). Antioxidative activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts obtained from different varieties grown in Turkey. *International Journal of Food Science and Technology*, **43**, 154-159.
- Yildirim, H.K., Akçay, Y.D., Güvenç, U., Altindisli, A. & Sözmen, E.Y. (2005). Antioxidant activities of organic grape, pomace, juice, must, wine and their correlation with phenolic content. *International Journal of Food Science and Technology*, **40**, 133-142.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O bagaço de uva representa uma fonte de compostos fenólicos que possuem elevada atividade antioxidante *in vitro*. Além disso, o óleo obtido a partir do bagaço de uva, proveniente basicamente das sementes, é rico em ácidos graxos insaturados de alto valor nutritivo. Estas características conferem a este resíduo grande potencial de aproveitamento.

Como próximo passo, os extratos de bagaço de uva devem ser testados em sistemas modelos de alimentos a fim de avaliar sua eficácia antioxidante, visando à aplicação desse subproduto agroindustrial, agregando valor ao mesmo e oferecendo assim uma nova possibilidade de aproveitamento do resíduo. Também devem ser realizados testes *in vivo* para avaliar os possíveis benefícios da utilização desta matéria-prima para a saúde humana.