

Ismael Ivan Rockenbach

**CARACTERIZAÇÃO FENÓLICA E ANTIOXIDANTE DE
SUBPRODUTOS DA VINIFICAÇÃO**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos
da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutor em Ciência dos Alimentos
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roseane Fett

Florianópolis
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rockenbach, Ismael Ivan
Caracterização fenólica e antioxidante de subprodutos da
vinificação [tese] / Ismael Ivan Rockenbach ; orientadora,
Roseane Fett - Florianópolis, SC, 2012.
112 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Subprodutos da vinificação.
3. Compostos Fenólicos. 4. Atividade antioxidante. I. Fett,
Roseane. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III.
Título.

Este trabalho é dedicado à minha
família.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus, pela força, confiança e proteção.

À Professora Dra. Roseane Fett pela oportunidade concedida, pela amizade, pela confiança e pelos conselhos.

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 técnico e amigo do laboratório de Química de Alimentos Luciano Valdemiro Gonzaga pela amizade e parceria, pela convivência e experiência transmitida.

À Professora Dra. Maria Ines Genovese Rodriguez da Universidade de São Paulo pelo aceite da relatoria deste trabalho. Meu muito obrigado.

Aos amigos e aos colegas de laboratório Graciele da Silva Campelo Borges, Cristiane Copetti, Eliseu Rodrigues, Viviane Maria Rizelio, Dra. Ana Carolina de Oliveira Costa, Dr. Fábio Cristiano Angonesi Brod, Any Elisa de Souza Schmidt Gonçalves, Marcela Roquim Alezandro, Alexandre Pugliese, Monique Hanauer, Bruna Mattioni, Anelise Schmidt, e demais que por ventura não tenham sido citados aqui.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos pela oportunidade concedida e pelo apoio.

Ao pesquisador Vinícius Caliarí da Estação Experimental de Videira da EPAGRI, Santa Catarina, pela viabilização das amostras para este estudo.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos Sérgio Souza pelo apoio burocrático e pela amizade.

À CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado no País.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior.

Ao DAAD – Instituto Alemão de Intercâmbio Acadêmico, pela concessão de Curso de Idioma Alemão na Alemanha, bem como por todo o apoio concedido.

Ao Professor Dr. Rudolf Galensa pela parceria e disponibilização de seu grupo de trabalho e laboratórios na Alemanha para viabilização deste estudo, bem como pela orientação e suporte durante todo o período de permanência na Universidade de Bonn.

Ao Professor Dr. Friedhelm Marx pelos primeiros contatos com o laboratório da Alemanha, pela amizade e por todo o suporte nas mais

diversas questões burocráticas antes, durante e depois da estadia na Alemanha.

Um muito obrigado de coração a todos os amigos e colegas do laboratório de Química de Alimentos da Universidade de Bonn, em Bonn, na Alemanha. Em primeiro lugar pela amizade, pelos momentos de diversão e pela confiança estabelecida. Além disso, por tudo o que pude aprender no dia-a-dia da vivência de laboratório. As lembranças ficarão para sempre!

“Filho, sou teu pai, sou teu amigo,
por isso escuta o que eu digo,
minha experiência é quem fala.
Melhor aprende o que cala, e ouve com atenção.
Este destino de peão, não te vou deixar de
herança,
porque me sobra esperança, de ver-te um dia
patrão.
Filho, meu velho também foi peão, e acostumou-
se ao patrão,
politiqueiro e caudilho,
por sinal, pai de um filho que a força se fez
doutor.
E eu na solidão do meu rancho,
só aprendi a fazer garrancho prá votar neste
senhor.
Filho, agora é chegada a hora, de saíres campo
afora,
rumo à estância do saber.
Que este teu velho peão pobre, há muito que junta
os cobres,
pra te mandar aprender.
Anda, vai e doma a leitura, te amansa em
literatura,
e prende no laço a ciência,
que ao longo de tua ausência,
hei de rezar ao senhor,
prá que voltes à querência,
um verdadeiro doutor.”

(Canção *Conselhos*, de Marco A. Vasconcelos e
Kenelmo A. Alves, interpretada por Wilson Paim)

RESUMO

O conteúdo de compostos fenólicos e a atividade antioxidante de extratos obtidos a partir do bagaço da vinificação de uvas tintas (variedades Cabernet Sauvignon, Merlot, Bordeaux, Isabel, Sangiovese, Primitivo, Pinot Noir e Negro Amaro) largamente produzidas no Brasil para a vinificação foram determinados a fim de avaliar o potencial deste subproduto como fonte de antioxidantes naturais. Os teores de compostos fenólicos foram maiores nas sementes do que nas cascas. Os maiores valores de atividade antioxidante determinada como habilidade de desativação de radicais livres DPPH e poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) foram encontrados para as sementes da variedade Pinot Noir (16925 μmol equivalentes ao Trolox (TEAC)/100 g e 21492 μmol Fe^{2+} /100 g, respectivamente). O bagaço de uva da variedade Bordeaux apresentou o maior poder de inibição da oxidação (41,13%), determinado pelo método de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico, assim como o maior conteúdo de antocianinas (HPLC; 29,17 mg/g). Os extratos de semente de uva apresentaram elevadas concentrações de flavanóis oligoméricos e poliméricos. As análises por eletroforese capilar utilizando seletor quiral mostraram que as condições do processo de fermentação da produção de vinho não deram origem aos enantiômeros (-)-catequina e (+)-epicatequina. Somente (+)-catequina e (-)-epicatequina puderam ser identificados. As análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas com um sistema de ionização por eletrospray (HPLC-ESI-MSⁿ) mostraram a presença de diversos compostos flavan-3-ol galoilados e não-galoilados e a presença de produtos condensados de catequina com acetaldeído, tentativamente identificados como dímeros e trímeros de etil-(epi)catequina. Oligômeros com até 4 unidades monoméricas puderam ser detectados. Os dados obtidos sugerem que os subprodutos da vinificação, especialmente as sementes de uva da variedade Pinot Noir, apresentam grande potencial como fonte de compostos fenólicos antioxidantes.

Palavras-chave: Subprodutos da vinificação, Compostos fenólicos, Atividade antioxidante.

ABSTRACT

The phenolic compounds content and the antioxidant activity of extracts of pomace from the vinification of red grape varieties widely produced in Brazil (varieties Cabernet Sauvignon, Merlot, Bordeaux, Isabel, Sangiovese, Primitivo, Pinot Noir and Negro Amaro) were determined with a view to their exploitation as a potential source of natural antioxidants. There was a higher concentration of phenolic compounds in the seeds than in the skins. The highest antioxidant activity values determined as DPPH radical-scavenging ability and ferric reducing-antioxidant power (FRAP) were found for the seeds of the Pinot Noir variety (16925 μmol Trolox equivalents (TE)/100 g and 21492 μmol Fe^{2+} /100 g, respectively). The pomace of Bordeaux grape variety showed the highest oxidation inhibition power (41.13%), determined using the β -carotene/linoleic acid method and the highest content of total anthocyanins (HPLC; 29.17 mg/g). The grape seed extracts were rich in oligomeric and polymeric flavanols. Chiral capillary electrophoretic analysis showed that the fermentation process of winemaking did not give rise to (-)-catechin and (+)-epicatechin enantiomers. Only (+)-catechin and (-)-epicatechin were detected. High-performance liquid chromatography coupled with an ion trap mass spectrometer (HPLC-ESI-MSⁿ) showed the presence of several different galloylated and non-galloylated flavan-3-ol compounds and the presence of condensed products of catechin with acetaldehyde, presumably assigned to (epi)catechin-ethyl dimers and trimers. Oligomers with up to four monomeric units were detected. The data suggested that the winemaking byproducts, especially the seeds of Pinot Noir grape variety, showed great potential as a source of phenolic compounds with high antioxidant activity.

Keywords: Winemaking byproducts, Phenolic compounds, Antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura básica do cacho de uva.	32
Figura 2 – O bagaço da vinificação.	33
Figura 3 – Monômeros das proantocianidinas.	37
Figura 4 – Cromatograma da (A) mistura de padrões contendo ácido gálico, catequina, epicatequina, <i>t</i> -resveratrol, rutina, quercetina e campferol; e do (B) extrato de bagaço de uva da variedade Merlot (<i>Vitis vinifera</i> L.) (processado a 270 nm).	47
Figura 5 – Rendimento da extração de sólidos solúveis do bagaço de uva (média ± intervalo de confiança, $p < 0,05$).	51
Figura 6 – Poder de inibição da oxidação de extratos de bagaço de uva e BHT a 100 mg/L no sistema β -caroteno/ácido linoléico. C = Cabernet Sauvignon; M = Merlot; B = Bordeaux; I = Isabel.	56
Figura 7 – Estrutura química básica dos enantiômeros de catequina e epicatequina.	75
Figura 8 – Sobreposição de eletroferogramas da separação quiral dos padrões de (+)/(-)-catequina e (-)-epicatequina e do extrato de semente de uva da variedade Pinot Noir utilizando a (2-hidroxiopropil)- γ -ciclodextrina como seletor quiral.	80
Figura 9 – Cromatograma (HPLC-DAD) obtido a partir do extrato da semente de uva da variedade Pinot Noir (processado a 280 nm). A identificação dos picos numerados encontra-se na Tabela 8.	90
Figura 10 – Estrutura química básica de possíveis dímeros e trímeros de etil-(epi)catequina.	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de uvas no Brasil, em toneladas.	30
Tabela 2 - Produção de vinhos e suco de uva do Estado de Santa Catarina, em litros.	31
Tabela 3 - 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.).	52
Tabela 4 - Compostos fenólicos em extratos de bagaços de uvas tintas (<i>Vitis vinifera</i> L. e <i>Vitis labrusca</i> L.).	54
Tabela 5 - Fenólicos totais, flavanóis totais, atividade antioxidante de desativação de radicais DPPH e poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) de extratos de casca e semente de uva (<i>Vitis vinifera</i> L. e <i>Vitis labrusca</i> L.).	65
Tabela 6 - Compostos Fenólicos de cascas de uva (<i>Vitis vinifera</i> L. e <i>Vitis labrusca</i> L.) identificados por HPLC.	69
Tabela 7 - Compostos Fenólicos de sementes de uva (<i>Vitis vinifera</i> L. e <i>Vitis labrusca</i> L.) identificados por HPLC.	70
Tabela 8 - Compostos fenólicos nas sementes de diferentes variedades de uva (<i>Vitis vinifera</i> e <i>Vitis labrusca</i>) identificados por HPLC-ESI-MS ⁿ	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BHA – Butil Hidroxianisol
BHT – Butil Hidroxitolueno
bs – base seca
CE – *Catechin Equivalent* (Equivalente à Catequina)
DAD – *Diode-Array Detector* (Detector de arranjo de diodos)
DHA – Ácido Docosaheptaenóico
DMSO – Dimetilsulfóxido
DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EC – Eletroforese capilar
ECQ – Eletroforese capilar utilizando seletor quirál
EPA – Ácido Eicosapentaenóico
ESI – *Electrospray ionization* (Ionização por eletrospray)
FRAP – *Ferric Reducing Antioxidant Power* (Poder antioxidante de redução do ferro)
GAE – *Gallic Acid Equivalent* (Equivalente a Ácido Gálico)
HPLC – *High-Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HRF – *Heterocyclic Ring Fission* (Fissão do anel heterocíclico)
i.d. – diâmetro interno
L – Litro(s)
min – minuto(s)
MS – *Mass spectrometry* (Espectrometria de Massas)
o.d. = diâmetro externo
ORAC – *Oxygen radical absorbance capacity* (Capacidade de absorver o radical oxigênio)
PLE – *Pressurized Liquid Extraction* (Extração líquida pressurizada)
p.s.i. – libra por polegada quadrada
PTFE – Politetrafluoretileno
RDA – (*retro-Diels-Alder*)
s – segundo(s)
SPE – *Solid Phase Extraction* (Extração em fase sólida)
TBHQ – Terc-butil-hidroquinona
TEAC – *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox)
TROLOX – Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetra-metilcromo-2-carboxílico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1 A VITICULTURA NO BRASIL E EM SANTA CATARINA	29
2.2 OS SUBPRODUTOS DA VINIFICAÇÃO	31
2.3 A VALORIZAÇÃO DOS SUBPRODUTOS DA VINIFICAÇÃO	33
2.4 COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS SUBPRODUTOS DA VINIFICAÇÃO	34
2.4.1 Proantocianidinas	37
3 CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE BAGAÇOS DE UVAS TINTAS (<i>Vitis vinifera</i> L. E <i>Vitis labrusca</i> L.) LARGAMENTE PRODUZIDAS NO BRASIL	43
3.1 INTRODUÇÃO	43
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.2.1 Reagentes	44
3.2.2 Amostras	45
3.2.3 Preparação dos extratos	45
3.2.4 Conteúdo de compostos fenólicos totais	46
3.2.5 Conteúdo de antocianinas totais	46
3.2.6 Determinação de compostos fenólicos por HPLC	47
3.2.7 Determinação da atividade antioxidante – Método ABTS	49
3.2.8 Determinação da atividade antioxidante – Método DPPH	49
3.2.9 Determinação do poder redutor – Método FRAP	49
3.2.10 Poder de inibição da oxidação - Método de co-oxidação do β-caroteno/ácido linoléico	49
3.2.11 Análise estatística	50
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
3.3.1 Rendimento da extração de sólidos solúveis, fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais	51
3.3.2 Compostos fenólicos individuais	53
3.3.3 Atividade antioxidante e poder redutor	55
3.3.4 Poder de inibição da oxidação	56
3.4 CONCLUSÕES	57
4 COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE SEMENTE E CASCA DE BAGAÇO DE UVAS TINTAS (<i>Vitis vinifera</i> L. E <i>Vitis labrusca</i> L.) DA PRODUÇÃO DE VINHO NO BRASIL	59
4.1 INTRODUÇÃO	59

4.2 MATERIAL E MÉTODOS	60
4.2.1 Amostras e reagentes	60
4.2.2 Preparo de extratos	61
4.2.3 Compostos fenólicos totais	62
4.2.4 Flavanóis totais	62
4.2.5 Determinação de compostos fenólicos por HPLC	62
4.2.6 Atividade antioxidante de desativação de radicais DPPH	63
4.2.7 Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)	63
4.2.8 Análise Estatística	64
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.3.1 Compostos fenólicos totais, flavanóis totais e atividade antioxidante	64
4.3.2 Compostos fenólicos por HPLC	68
4.4 CONCLUSÕES	72
5 PERFIL DE COMPOSTOS FLAVAN-3-OL GALOILADOS E NÃO GALOILADOS E INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE ENANTIÔMEROS DE CATEQUINA E EPICATEQUINA EM SEMENTES DE BAGAÇOS DE UVAS TINTAS (<i>Vitis vinifera</i> E <i>Vitis labrusca</i>) DA PRODUÇÃO DE VINHO NO BRASIL	73
5.1 INTRODUÇÃO	73
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	76
5.2.1 Amostras e reagentes	76
5.2.2 Extração de polifenóis das amostras secas	76
5.2.3 Extração em fase sólida (SPE)	77
5.2.4 Eletroforese capilar utilizando seletor quiral	77
5.2.5 Identificação dos compostos flavan-3-ol galoilados e não-galoilados por HPLC-ESI-MS ⁿ	78
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
5.3.1 Eletroforese capilar utilizando seletor quiral	79
5.3.2 Identificação dos compostos flavan-3-ol galoilados e não-galoilados por HPLC-ESI-MS ⁿ	80
5.4 CONCLUSÕES	95
CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
REFERÊNCIAS	99

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, por ser um país de grande atividade agrícola, é um dos maiores geradores de subprodutos agroindustriais. Neste contexto se encaixa a vitivinicultura, que é uma atividade econômica consolidada, com importância socioeconômica, principalmente nos Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. É uma atividade importante para a sustentabilidade das pequenas propriedades, e nos últimos anos tem se tornado importante também na geração de emprego, em grandes empreendimentos para produção de uvas de mesa e uvas para processamento (MELLO, 2011).

Um dos subprodutos industriais da produção de vinho é o bagaço de uva, que consiste basicamente de sementes e cascas. A maior parte do bagaço formado a partir da produção de vinho no Brasil, aproximadamente 59,4 milhões de toneladas de bagaço considerando 18 kg de bagaço/100 L de vinho, é tratada como resíduo de baixo valor econômico e utilizada como ração animal e esterco (CAMPOS et al., 2008). Do bagaço separado durante as etapas de esmagamento e prensagem das uvas, apenas pequenas quantidades são valorizadas ou aproveitadas. 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 subprodutos gerados apresentam sérios problemas de armazenagem, de transformação, ou de eliminação, em termos ecológicos e econômicos.

Em comparação aos estudos químicos envolvendo os constituintes dos vinhos, o bagaço de uva tem sido muito pouco investigado, sendo, no entanto, rico em compostos de interesse para a saúde, como os compostos fenólicos (AMICO et al., 2004). É de conhecimento científico o potencial antioxidante dos compostos fenólicos, atuando como redutores de oxigênio singlete, na inibição das reações de oxidação lipídica e na quelatação de metais. Além disso, apresentam uma ampla gama de propriedades farmacológicas, como antialérgicas, antiarteriogênicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antitrombóticas e também efeitos cardioprotetores e vasodilatadores (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2001; MANACH et al., 2005).

Moure et al. (2001), em revisão sobre subprodutos industriais como fontes de compostos antioxidantes, apresentam os subprodutos do processamento da uva como a fonte mais promissora para ser aproveitada com esta finalidade. Sánchez-Alonso et al. (2008) realizaram um estudo na Espanha com subprodutos da vinificação e

observaram alta atividade antioxidante e capacidade destes de inibir significativamente o desenvolvimento da rancidez em músculo de peixe congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Há também um interesse crescente na utilização de extratos vegetais como antimicrobianos naturais para a substituição dos aditivos sintéticos empregados na prevenção contra a deterioração microbiana em alimentos, uma vez que os extratos vegetais podem apresentar tanto atividade antioxidante quanto antimicrobiana (JAYAPRAKASHA; SELVI; SAKARIAH, 2003).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo caracterizar a composição fenólica e avaliar o potencial antioxidante de subprodutos gerados a partir da produção do vinho. Foram analisadas neste estudo as frações de bagaço, cascas e sementes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A VITICULTURA NO BRASIL E EM SANTA CATARINA

A viticultura é uma atividade tradicional em nove regiões brasileiras. Como zonas de viticultura temperada destacam-se as regiões da Fronteira, Serra do Sudeste, Serra Gaúcha, Campos de Cima da Serra e regiões Central e Norte do Estado do Rio Grande do Sul; as regiões do Vale do Rio do Peixe, Planalto Serrano e Planalto Norte e Carbonífera, no Estado de Santa Catarina; a região Sudeste do Estado de São Paulo, e a região Sul do Estado de Minas Gerais. A região Norte do Paraná é tipicamente subtropical e as regiões Noroeste do Estado de São Paulo, Norte do Estado de Minas Gerais e Vale do Sub-Médio São Francisco (Pernambuco e Bahia) caracterizam-se como zonas tropicais, com sistemas de manejo adaptado as suas condições ambientais específicas. Além destes, novos pólos vitivinícolas estão surgindo em diferentes regiões do país, seja sob condições temperadas, tropicais ou subtropicais (IBRAVIN, 2012).

Concentrada nos Estados do Sul e do Sudeste, a viticultura de clima temperado já é tradicional, representando cerca de 88% da área de vinhedos e mais de 98% da uva utilizada para processamento (vinhos, sucos e outros derivados) do país. Vários são os sistemas de manejo utilizados, dependendo da região e do tipo de produto objeto da produção. Em sua maioria são utilizados cultivares e porta-enxertos convencionais, oriundos de outros países. Entretanto, algumas novas cultivares, criadas no Brasil, estão em fase de franca expansão comercial (IBRAVIN, 2012).

Localizada no Estado de Santa Catarina, na latitude de 27 °S, longitude de 51 °W e altitude de 600-800 m, a região do Vale do Rio do Peixe apresenta como indicadores climáticos médios 1.800 mm de precipitação anual, temperatura de 17,1 °C e umidade relativa do ar de 80%. A viticultura ocupa cerca de 2.200 hectares. Apresenta grande similaridade com a Região da Serra Gaúcha quanto à estrutura fundiária, topografia e tipo de exploração vitícola, baseada no uso da mão-de-obra familiar e voltada à produção de uvas, em sua maioria, para a elaboração de vinho de mesa e suco de uva. A cultivar Isabel ocupa cerca de 75% da área de vinhedos. Predomina o sistema de condução latada e a densidade de plantio situa-se entre 1.600 a 3.000 plantas por hectare. Nesta região, a produção de uvas viníferas não chega a 5% do volume total produzido, entretanto, há a manifesta intenção de produtores

tradicionais de vinhos de mesa de migrarem para a produção de vinhos finos (IBRAVIN, 2012).

Em 2010, praticamente a metade da uva produzida no Brasil (43,07%) foi destinada ao processamento para a elaboração de vinhos, suco de uva e derivados, sendo o restante destinado ao mercado de uva in natura. Problemas climáticos foram responsáveis pela redução na produção de uvas para processamento, em especial no estado do Rio Grande do Sul. A produção de uvas no Brasil somou 1,29 milhão de toneladas em 2010 – 3,74% a menos do que em 2009, quando foram produzidos 1,34 milhão de toneladas (Tabela 1). Como observa a pesquisadora da Embrapa Uva e Vinho, Loiva Maria Ribeiro de Mello (MELLO, 2011), tendo por base dados coletados no IBGE e no IBRAVIN (Instituto Brasileiro do Vinho), a produção de uvas apresentou redução na maioria dos estados brasileiros em 2010.

Tabela 1 - Produção de uvas no Brasil, em toneladas.

Estado/Ano	2007	2008	2009	2010
Pernambuco	170.326	162.977	158.515	168.225
Bahia	120.654	97.481	90.508	78.283
Minas Gerais	11.995	13.711	11.773	10.590
São Paulo	193.023	192.976	177.934	177.538
Paraná	99.180	101.500	102.080	101.900
Santa Catarina	54.554	58.330	67.546	66.214
Rio Grande do Sul	705.228	776.027	737.363	692.692
Brasil	1.354.960	1.403.002	1.345.719	1.295.442

FONTE: Mello (2011).

A maior redução na produção de uvas em 2010 ocorreu no estado da Bahia (-13,51%), seguida por Minas Gerais (-10,05%). O Rio Grande do Sul, principal estado produtor de uvas e vinhos do país, apresentou queda de 6,06% na produção. Santa Catarina (1,97%) e Paraná (0,18%) também apresentaram redução na produção de uvas. O único estado a apresentar aumento na produção de uvas foi Pernambuco (6,13%) (MELLO, 2011).

Santa Catarina apresentou aumento de 2,33% na área plantada. Embora não apareça nas estatísticas do IBGE, a viticultura está sendo implantada em vários estados, como Mato Grosso do Sul, Goiás, Espírito Santo, Ceará e Piauí (MELLO, 2011).

O estado de Santa Catarina possui dados de uvas processadas, vinhos e derivados, no entanto, não tem informações sobre a comercialização de seus produtos. Segundo dados da Superintendência Federal da Agricultura do Estado de Santa Catarina, foram produzidos, em 2010, 12,68 milhões de litros de vinho, sendo 98,31% de vinhos de mesa (Tabela 2). O Estado também produz uma pequena quantidade de mosto de uva e espumante (MELLO, 2011).

Tabela 2 - Produção de vinhos e suco de uva do Estado de Santa Catarina, em litros.

Produção	2007	2008	2009	2010
Vinho de mesa	21.939.620	17.750.128	11.203.414	12.468.009
Tinto	17.197.738	14.299.532	9.695.301	10.511.009
Branco	128.750	32.644	2.200	1.250
Rosado	4.613.132	3.417.952	1.505.913	1.955.750
Vinho Fino	252.422	335.257	237.333	214.022
Tinto	196.752	209.842	207.331	158.016
Branco	15.882	59.915	12.511	23.700
Rosado	39.788	65.500	17.491	32.306
Espumante	7.897	15.375	50.278	58.950
Mosto de uva	44.500	774.500	16.348	755.957
Total	22.244.439	18.875.260	11.507.373	13.496.938

FONTE: Mello (2011).

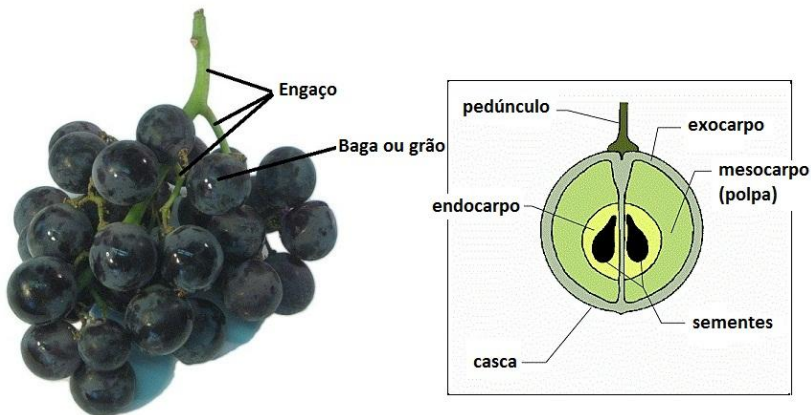
2.2 OS SUBPRODUTOS DA VINIFICAÇÃO

O cacho de uva é composto de duas partes bem distintas, a parte herbácea (denominada engaço) e a parte carnosa (denominada baga ou grão) (Figura 1). O engaço, parte que suporta as bagas, é constituído pelo pedúnculo e suas ramificações, correspondendo de 2 a 5% da uva madura, é rico em água, matéria lenhosa, resinas, minerais e taninos. A baga de uva é formada de 85 a 92% de polpa (que contém água, açúcares, ácidos orgânicos, etc.), 6 a 12% de casca ou película e de 2 a 5% de semente (que contém de 10 a 20% de óleo comestível de boa qualidade) (ORTIGARA, 2009).

Existem dois tipos básicos de vinho: o vinho branco e o vinho tinto. O vinho branco é obtido com a retirada das cascas e sementes após o desengace e esmagamento das bagas de uva, ou seja, consiste no

produto da fermentação do mosto clarificado. Os vinhos tintos resultam, usualmente, da fermentação de mostos não clarificados (mostos com cascas, bagas e sementes), preparados também a partir de uvas desengaçadas e esmagadas (RODRIGUES et al., 2006).

Figura 1 – Estrutura básica do cacho de uva.



Fonte: Do autor.

Segundo Silva (2003), os subprodutos da vinificação são caracterizados como sendo o bagaço (principal subproduto da vinificação), as sementes, o folhelho (conjunto constituído essencialmente pelas películas, após desidratação e separação das sementes e engaços, bem como pequenos fragmentos de engaçador), o engaçador (matéria prima mais pobre e de valorização mais simples), as borras (resíduos que ficam depositados nos recipientes que contenham vinho após a fermentação, armazenagem, filtração ou centrifugação) e o sarro (resíduos deixados pelos vinhos nas paredes dos recipientes que os contêm, formando um revestimento bastante duro).

O bagaço (Figura 2) é originado da prensagem das matérias-primas da vinificação constituídas pelas partes sólidas das uvas e pelo mosto, ou pelo conjunto mosto/vinho que as embebe. O bagaço, como resíduo da prensagem, representa de 12 a 15% em peso da matéria-prima inicial, contendo na sua composição restos de açúcares e outros glicídeos, proteínas e, nas sementes, um elevado teor de lipídeos (SILVA, 2003).

Em relação à composição química dos bagaços 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).

Figura 2 – O bagaço da vinificação.



Fonte: Do autor.

2.3 A VALORIZAÇÃO DOS SUBPRODUTOS DA VINIFICAÇÃO

Produtores e indústrias da área vinícola enfrentam o problema de descarte da biomassa residual, que, embora seja biodegradável, necessita de um tempo mínimo para ser mineralizada, constituindo-se em fonte de poluentes ambientais. Dados da indústria mostram que para 100 L de vinho branco produzidos geram-se 31,7 kg de subprodutos, dos quais 20 kg são de bagaço (CAMPOS, 2005).

Assim, a busca de alternativas para a utilização da matéria orgânica gerada vem crescendo dentro de vários centros de pesquisa. O interesse crescente na exploração dos subprodutos gerados pela indústria do vinho deve-se, em grande parte, ao elevado conteúdo de polifenóis encontrado nestes subprodutos (ALONSO et al., 2002; NEGRO; TOMMASI; MICELI, 2003; KAMMERER et al., 2004; GONZÁLEZ-PARAMÁS et al., 2004). Os compostos fenólicos presentes nas uvas passam para o vinho, mais ou menos, dependendo 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).

As antocianinas extraídas dos subprodutos da vinificação, conhecidas como “enocianinas”, têm sido comercializadas desde 1879. Atualmente, tem emergido dentro da indústria do vinho outro comércio bastante viável e oportuno. Esta indústria produz extratos de casca e de semente de uva que têm encontrado diversas aplicações como antioxidantes naturais em alimentos ou suplementos dietéticos para a prevenção de doenças (ALONSO et al., 2002).

Extratos dos subprodutos da vinificação são utilizados como combinações de substâncias ativas também para composições cosméticas e farmacêuticas. Estas composições são utilizadas na elaboração de produtos para a pele e cabelo, tratamento de hemorróidas, ou para redução de triglicerídeos plasmáticos, agregação plaquetária e capacidade oxidativa. Além disso, uma solução conservante para frutas e vegetais sem casca, sucos e flores cortadas foi patenteada, incluindo flavonóides provenientes do óleo de semente de uva (ALONSO et al., 2002).

As sementes de uva representam uma importante fonte de óleo, possuindo de 10 a 20% de óleo que é especialmente rico em ácidos graxos insaturados. Ácidos graxos poli-insaturados, 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 de uva, rico em ácido linoléico, pode representar uma fonte valiosa de óleo dietético (GÖKTÜRK BAYDAR; ÖZKAN; ÇETIN, 2007).

2.4 COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS SUBPRODUTOS DA VINIFICAÇÃO

Vários trabalhos publicados mostram que os subprodutos da vinificação são fontes abundantes de compostos fenólicos, com elevada atividade antioxidante, como alguns dos trabalhos publicados pelo grupo de pesquisa em Antioxidantes e Corantes Naturais do Laboratório de Química de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina (ROCKENBACH et al., 2007; CATANEO et al., 2008; SOARES et al., 2008).

Os compostos fenólicos presentes nas uvas incluem ácidos fenólicos, flavonóides, antocianinas e proantocianidinas (LU; FOO, 1999). Estes constituintes podem ser divididos em dois grupos: não-flavonóides (ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos, e estilbenos) e

flavonóides (antocianinas, compostos flavan-3-ols e flavonóis). As antocianinas são a família de compostos fenólicos diretamente responsáveis pela cor das uvas e dos vinhos. Os compostos flavan-3-ols (catequinas monoméricas e proantocianidinas) são outra grande família de compostos fenólicos e são responsáveis principalmente pela adstringência, amargor e estrutura dos vinhos. Os flavonóis (quercetina, miricetina, campferol, isorhamnetina e seus glicosídeos) também contribuem para o amargor (MONTEALEGRE et al., 2006).

Na uva, os compostos fenólicos estão presentes principalmente nas cascas e nas sementes, com quantidades bem menores na polpa. Os flavonóis são os compostos mais abundantes nas cascas, enquanto que as sementes são ricas em flavan-3-ols (MONTEALEGRE et al., 2006). Kammerer et al. (2004) caracterizaram os compostos fenólicos de 14 diferentes amostras de bagaço de uva, sendo identificados 13 tipos de antocianinas, 11 ácidos fenólicos, 13 catequinas e flavonóis e 2 estilbenos.

Extratos de semente de uva contêm uma mistura heterogênea de monômeros, oligômeros e polímeros formados por subunidades de compostos flavan-3-ols (GONZÁLEZ-PARAMÁS et al., 2004), como, por exemplo, (+)-catequina, (-)-epicatequina e (-)-epicatequina-3-O-galato (JAYAPRAKASHA; SINGH; SAKARIAH, 2001). No estudo realizado por González-Paramás et al. (2004), o conteúdo total de flavanóis no bagaço de diferentes variedades de uva apresentou grande variação entre as amostras, com valores variando de 29 a 199 mg/100 g em base seca, bem como nas sementes separadas a partir destes bagaços, com valores variando de 136 a 719 mg/100 g em base seca.

Em estudo realizado por Makris, Boskou e Andrikopoulos (2007) foram determinados os teores de compostos fenólicos em extratos obtidos de subprodutos da vinificação e de outros subprodutos agroindustriais. Os teores de fenólicos totais em sementes de uva branca (11108 mg equivalente a ácido gálico (GAE)/100 g em base seca) e tinta (10330 mg GAE/100 g em base seca) foram bastante superiores aos teores observados em folhas de oliveira, cascas de maçã, de cebola e de batata.

É de amplo conhecimento que os compostos fenólicos exercem atividade antioxidante em sistemas biológicos. Para estimar a capacidade inibitória destes compostos frente a espécies reativas, frequentemente são reportados na literatura dados de correlação entre atividade antioxidante e concentração de compostos fenólicos (SCALZO et al., 2005; DEEPA et al., 2007). As amostras avaliadas podem incluir diferentes genótipos, amostras em diferentes estágios de

maturação, ou até amostras expostas a diferentes condições de armazenamento após a colheita (JACOBO-VELÁZQUEZ; CISNEROS-ZEVALLOS, 2009).

A atividade antioxidante de um composto fenólico está relacionada com o número de grupos hidroxila disponíveis presentes na estrutura química (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). Assim, a maneira pela qual este composto vai neutralizar os radicais livres vai depender da sua concentração relativa na matriz da amostra. Além disso, os compostos fenólicos podem atuar de forma sinérgica (CIRICO; OMAJE, 2006), aditiva (HEO et al., 2007), ou antagonística (PEYRAT-MAILLARD; CUVELIER; BERSET, 2003) para desativar espécies reativas. No entanto, as abordagens típicas utilizadas para avaliar as correlações entre a atividade antioxidante total e o conteúdo de fenólicos totais não refletem estas características dos compostos fenólicos (JACOBO-VELÁZQUEZ; CISNEROS-ZEVALLOS, 2009).

No caso dos flavonóides, que possuem um esqueleto difenilpropano, sua eficiência como neutralizadores de radicais livres parece depender principalmente do número de grupos hidroxila e sua posição na molécula. O potencial antioxidante é relacionado à estrutura em termos de rearranjo de elétrons no núcleo aromático. Por exemplo, o ângulo de torção do anel B em relação ao restante da molécula em flavonas e flavanonas comparado a um arranjo planar em flavonóis e flavanóis com um 3-OH sugere que a conformação planar favorece a conjugação, o rearranjo de elétrons, e um aumento na estabilidade do radical fenoxil (VAN ACKER et al., 1996). Além disso, a presença de glicosilações na molécula pode diminuir sua atividade antioxidante. Em geral, os arranjos estruturais dos flavonóides são considerados os responsáveis por conferir maior atividade antioxidante (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

No caso dos ácidos fenólicos (hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos) e seus derivados esterificados, sua atividade antioxidante depende do número de grupos hidroxila na molécula que são afetados por impedimento estérico do seu grupo carboxila. A proximidade do grupo carboxila e dos grupos hidroxila no anel fenólico em ácidos hidroxibenzóicos afeta negativamente sua capacidade de doar átomos de hidrogênio ou elétrons. Como resultado, normalmente observa-se uma atividade antioxidante maior nos ácidos hidroxicinâmicos em comparação com seus homólogos hidroxibenzóicos (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

Os compostos fenólicos poliméricos são antioxidantes mais potentes em comparação com os fenólicos monoméricos. Hagerman et

al. (1998) demonstraram que os taninos condensados e hidrolisáveis possuem maior habilidade antioxidante na complexação de radicais peroxila do que fenólicos simples. Yamaguchi et al. (1999) observaram que quanto maior é o grau de polimerização dos flavanóis, maior é a atividade de neutralização do radical superóxido. Um efeito similar foi observado para a capacidade de inibição do radical O_2^- , que aumentou com a elevação do grau de polimerização de proantocianidinas (SAINT-CRICQ DE GAULEJAC; PROVOST; VIVAS, 1999), ou para a maior inibição da peroxidação lipídica por dímeros de ácido ferúlico do que pelo próprio ácido ferúlico (GARCÍA-CONESA et al., 1999).

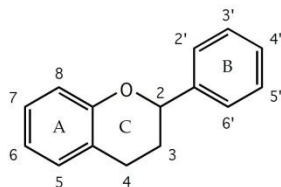
Yilmaz e Toledo (2004) obtiveram valores maiores de atividade antioxidante no ensaio ORAC para extratos de semente de uva do que para extratos de casca de uva. Estes autores calcularam a contribuição dos compostos identificados nos extratos e sua concentração e atividade antioxidante como compostos puros de ácido gálico, catequina e epicatequina para a atividade antioxidante total das amostras. Estes três últimos compostos contribuíram em menos de 26% para os valores de ORAC nos extratos de semente e casca de uva. Assim, os autores concluíram que a elevada atividade antioxidante das cascas e sementes de uva estava relacionada principalmente à presença de proantocianidinas poliméricas em adição aos monômeros identificados.

2.4.1 Proantocianidinas

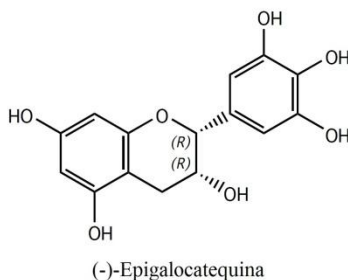
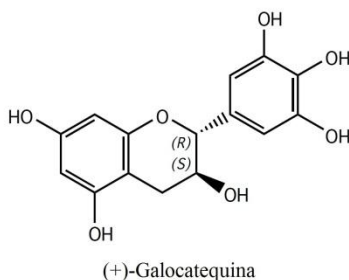
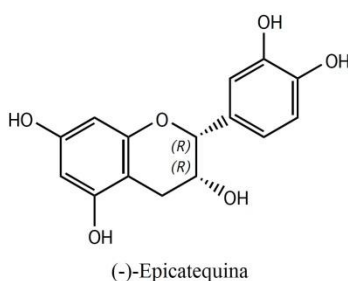
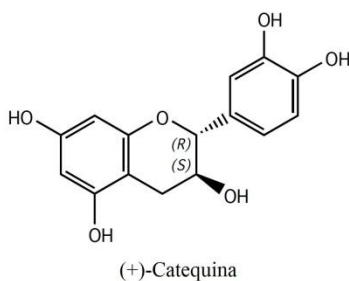
A nomenclatura das proantocianidinas é bastante confusa, uma vez que existem diferentes sistemas e diversos nomes triviais. Os sinônimos mais populares para designar as proantocianidinas são: procianidinas, antocianogênes, catequinas, taninos, taninos condensados, taninogênes e tanóides. Estes nomes, por vezes, ainda são usados para designar outros compostos que não são proantocianidinas ou ainda como um termo genérico para um grupo de polifenóis, incluindo proantocianidinas (ZIMMERMANN, 2005).

As proantocianidinas são oligômeros e polímeros dos compostos flavan-3-ols (+)-catequina, (+)-galocatequina, (-)-epicatequina e (-)-epigalocatequina (Figura 3). Outros monômeros podem ser encontrados raramente (ZIMMERMANN, 2005).

Figura 3 – Monômeros das proantocianidinas.



Esqueleto flavonóide e numeração



Fonte: Zimmermann (2005).

Os monômeros das proantocianidinas são ligados principalmente por ligações C4-C8, embora ligações C4-C6 também podem ocorrer. Ambas as estruturas são definidas como proantocianidinas tipo B. As proantocianidinas do tipo B podem ocorrer esterificadas com ácido gálico, formando 3-O-galatos através das unidades de (-)-epicatequina. Em adição às ligações C4-C8, as unidades de compostos flavan-3-ols também podem estar duplamente ligadas por uma ligação éter C2-C7, dando origem às estruturas de proantocianidinas tipo A, resultantes de uma reação oxidativa intramolecular (PASSOS et al., 2007).

Em sementes de uva, as proantocianidinas representam, em geral, a maior parte do extrato polifenólico total, e sua extrema complexidade é resultado do grande número de compostos diferentes com estruturas muito similares (DE FREITAS et al., 1998). As proantocianidinas em uvas e vinhos têm sido associadas ao fenômeno chamado de “Paradoxo Francês”. Muitos outros efeitos benéficos para a saúde, como efeitos antioxidantes, anticarcinogênicos e anti-inflamatórios, têm sido descritos para as proantocianidinas de semente de uva (GU et al., 2003). Proantocianidinas de semente de uva foram associadas à indução de apoptose e inibição de metástase em cultura de células de câncer de mama e cólon (MANTENA; BALIGA; KATIYAR, 2006). Em outro estudo, um extrato etanólico de farinha de semente de uva da variedade Chardonnay não apenas suprimiu a peroxidação lipídica em geral de óleo de peixe, mas também protegeu os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), os mais bioativos ácidos graxos n-3, contra a perda oxidativa (LUTHER et al., 2007).

Uma vez que uma quantidade substancial de proantocianidinas presentes nas frutas, incluindo as uvas, está em uma forma não prontamente disponível para absorção, torna-se importante a investigação do teor de proantocianidinas presentes nas suas sementes e no bagaço em relação à presença de monômeros e polímeros (KHANAL; HOWARD; PRIOR, 2009). Considerando as proantocianidinas, oligômeros de cadeia curta têm sido isolados e bem caracterizados por longo tempo, enquanto que oligômeros de cadeia longa e polímeros, que constituem uma grande proporção das proantocianidinas em plantas, foram estudados e isolados parcialmente apenas recentemente (SUN; SPRANGER, 2005).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa tem sido o método mais utilizado para a análise quantitativa de proantocianidinas em plantas e amostras derivadas de plantas. No entanto, a HPLC em fase reversa permite apenas a separação de proantocianidinas com até 3 unidades monoméricas, enquanto que oligômeros de cadeia maior e polímeros eluem de forma simultânea formando um pico largo de baixa resolução. Uma vez que os monômeros, dímeros e trímeros representam apenas uma pequena quantidade do conteúdo fenólico total, uma pré-purificação da amostra antes da análise por HPLC em fase reversa é frequentemente necessária. A presença de oligômeros de cadeia maior e proantocianidinas poliméricas, além de outros compostos fenólicos, resulta em baixa resolução e uma linha de base gradualmente crescente, o que dificulta a quantificação precisa dos compostos de baixo peso molecular. A HPLC

em fase normal também tem sido bastante utilizada nos últimos anos para a separação de proantocianidinas de semente de uva de acordo com seu grau de polimerização. No entanto, para a separação das proantocianidinas de semente de uva, a resolução na HPLC em fase normal é bem menor que a resolução obtida na HPLC em fase reversa e a sobreposição de picos é cada vez maior com o aumento do peso molecular dos compostos (SUN; SPRANGER, 2005).

A espectrometria de massas (MS) é um método muito eficaz e altamente sensível para a identificação de proantocianidinas de matrizes complexas. Atualmente, a ionização por eletrospray (ESI) tem se mostrado adequada para a análise de compostos polares em soluções aquosas sem nenhuma derivatização prévia da amostra. A ESI permite a identificação da massa molecular de proantocianidinas com diferentes graus de polimerização. Além disso, a espectrometria de massas sequencial (MS^n) pode fornecer maiores informações sobre os detalhes estruturais das diferentes moléculas. Estas técnicas, devido a sua alta precisão e sensibilidade, têm sido utilizadas para a identificação de proantocianidinas tipo A em uma ampla gama de materiais, como frutas, cereais, nozes e especiarias (PASSOS et al., 2007).

2.5 QUIRALIDADE DE COMPOSTOS FLAVAN-3-OLS

Os compostos flavan-3-ols como a catequina e a epicatequina, elementos estruturais básicos das proantocianidinas, possuem dois centros quirais, localizados nas posições C2- e C3- do anel C. Devido à via biossintética dos flavonóides nas plantas, predominantemente a (+)-catequina e a (-)-epicatequina são sintetizadas. (-)-Catequina e (+)-epicatequina são raramente encontradas na natureza (KOFINK; PAPAGIANNPOULOS; GALENSA, 2007a). Como descrito por Kodama et al. (2004), as catequinas podem ser utilizadas como compostos quirais. Por exemplo, foi descrito que (+)- e (-)-catequina apresentam efeitos opostos no metabolismo do glicogênio em hepatócitos isolados de ratos (NYFELER; MOSER; WALTER, 1983). Bais et al. (2002) descreveram que a (-)-catequina, mas não o seu (+)-isômero, apresenta atividade aleloquímica e que a (+)-catequina, mas não o seu (-)-isômero, apresenta atividade antibacteriana. Como demonstrado em estudos anteriores, os flavonóides podem ser utilizados também como parâmetros analíticos para garantir a autenticidade e a rastreabilidade de alimentos. Por exemplo, a naringina, um flavan-7-O -glicosídeo, serve como componente chave para comprovar a adição de

suco de uva a outros sucos de fruta (KOFINK; PAPAGIANNOPOULOS; GALENSA, 2007a).

Dentro deste contexto, torna-se relevante o estudo acerca da identificação/separação de compostos quirais como os constituintes elementares das proantocianidinas de extratos de semente de uva. Técnicas de separação instrumental, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa (CG), eletroforese capilar (EC), cromatografia de fluido super e subcrítico (CFS), e, mais recentemente, tecnologias baseadas em chips apresentam funções importantes na análise quiral, juntamente com as técnicas que não estão baseadas na separação dos compostos, como dicroísmo circular, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), cristalografia de raio-X, e, mais recentemente, espectroscopia de dicroísmo circular vibracional (DCV). Muitas outras técnicas experimentais, bem como cálculos teóricos, podem ser aplicados com maior ou menor sucesso para resolver problemas especialmente associados com a quiralidade e sua ocorrência na natureza. No entanto, as técnicas de separação mencionadas acima são aplicadas na grande maioria dos estudos (CHANKVETADZE, 2007).

Em relação aos métodos analíticos para a enantioseparação de flavonóides, a HPLC utilizando seletor quiral tornou-se um método adequado. No entanto, nos últimos anos, a eletroforese capilar utilizando seletor quiral (ECQ) estabeleceu-se como o método analítico de escolha para a separação quiral. A maior vantagem da ECQ é que o desenvolvimento do método é mais fácil e mais rápido comparado ao desenvolvimento do método na análise quiral por HPLC. São necessárias quantidades muito pequenas de amostra e consumo mínimo de solventes. Mas a maior desvantagem da ECQ é a baixa sensibilidade comparada com a HPLC. Para a identificação dos compostos, portanto, é indicada uma purificação adicional e a utilização da cromatografia líquida associada à espectrometria de massas (HPLC-MS) (KOFINK; PAPAGIANNOPOULOS; GALENSA, 2007a).

3 CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE BAGAÇOS DE UVAS TINTAS (*Vitis vinifera* L. E *Vitis labrusca* L.) LARGAMENTE PRODUZIDAS NO BRASIL

Resumo

O conteúdo de compostos fenólicos e a atividade antioxidante do bagaço da vinificação de uvas tintas (variedades Cabernet Sauvignon, Merlot, Bordeaux e Isabel) largamente produzidas no Brasil para a vinificação foram investigados a fim de avaliar o seu potencial como fonte de antioxidantes naturais. O bagaço de uva da variedade Cabernet Sauvignon apresentou o maior conteúdo de compostos fenólicos totais (74,75 mg equivalentes a ácido gálico (GAE)/g), os maiores valores de atividade antioxidante (determinada pelos métodos de desativação dos radicais livres 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) (ABTS) e 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH); 485,42 e 505,52 μmol equivalentes à capacidade antioxidante do Trolox (TEAC)/g, respectivamente) e o maior poder de redução (determinado pelo método do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP); 249,46 μmol TEAC/g). O bagaço de uva da variedade Bordeaux apresentou o maior poder de inibição da oxidação (41,13%), determinado pelo método de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico, assim como o maior conteúdo de antocianinas (HPLC; 29,17 mg/g). Para todas as variedades analisadas, a catequina foi o composto não-antociânico encontrado em maior quantidade (150,16 mg/100 g no bagaço da variedade Cabernet Sauvignon). Neste estudo, os bagaços das variedades Cabernet Sauvignon e Bordeaux apresentaram o maior potencial como fonte de compostos antioxidantes e corantes naturais, respectivamente.

Palavras-chave: Bagaço de uva, compostos fenólicos, atividade antioxidante, poder de inibição da oxidação, antocianinas.

3.1 INTRODUÇÃO

As principais classes de compostos antioxidantes encontrados na natureza são os flavonóides e os ácidos fenólicos na forma livre ou complexada. Estes compostos têm sido identificados e quantificados em diversas frutas e vegetais, e apresentam elevada correlação com a atividade antioxidante (EINBOND et al., 2004; SOARES, 2002). Uvas e vinhos contêm quantidades significativas de compostos fenólicos, principalmente flavonóides. A maioria dos compostos fenólicos

encontrados no vinho pode atuar como antioxidantes (YILDIRIM et al., 2005). Da mesma forma, os subprodutos da vinificação também são caracterizados por elevados conteúdos de compostos fenólicos devido à extração insuficiente durante a vinificação. De acordo com Shrikhande (2000), os extratos obtidos de uvas consistem principalmente de antocianinas das cascas e proantocianidinas das sementes.

Os subprodutos obtidos após a vinificação, tanto as sementes como o bagaço, constituem uma fonte barata para a extração de flavonóides antioxidantes, podendo ser utilizados na produção de fitoquímicos (GONZÁLEZ-PARAMÁS et al., 2004). Além disso, as antocianinas são consideradas como potenciais substitutos aos corantes sintéticos devido ao seu brilho, cor atrativa e solubilidade em água, o que permite sua incorporação em uma variedade de matrizes alimentares (BORDIGNON-LUIZ et al., 2007).

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).

A maior parte do bagaço formado a partir da produção de vinho no Brasil, aproximadamente 59,4 milhões de toneladas de bagaço considerando 18 kg de bagaço/100 L de vinho, é tratada como resíduo de baixo valor econômico e utilizada como ração animal e esterco. Portanto, o aproveitamento deste resíduo como um subproduto de valor agregado poderia representar ganhos econômicos significativos e prevenir ou diminuir os problemas ambientais causados pela acumulação do bagaço da vinificação (CAMPOS et al., 2008). Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o conteúdo de compostos fenólicos e a atividade antioxidante *in vitro* de bagaços de uvas tintas resultantes da produção de vinho no Brasil, a fim de avaliar o seu potencial como fonte de antioxidantes naturais.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Reagentes

2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) (ABTS), 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), β -caroteno, ácido linoléico, BHT (butil hidroxitolueno), Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico), catequina, epicatequina, ácido gálico, quercetina,

camferol, t-resveratrol e rutina foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemanha). Malvidina-3-glicosídeo foi adquirida da Polyphenols Laboratories AS (Sandnes, Noruega). Reagentes Folin-Ciocalteu, 2,4,6-Tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) e Tween 40 foram adquiridos da Fluka Chemie AG (Buchs, Suíça). Para as extrações e para a HPLC foram utilizados solventes de grau analítico/HPLC adquiridos da Merck (São Paulo, Brasil).

3.2.2 Amostras

Foram analisadas amostras de bagaços de uvas tintas das variedades: Cabernet Sauvignon e Merlot (*Vitis vinifera* L.), Bordeaux e Isabel (*Vitis labrusca* L.), todas largamente produzidas no Brasil para a vinificação. As amostras (safra 2008) foram obtidas de diferentes vinícolas (A, B e C) localizadas em Videira, Santa Catarina, Brasil. Cinco amostras de bagaço de uva da variedade Cabernet Sauvignon e cinco amostras da variedade Merlot foram obtidas da vinícola A, cinco amostras da variedade Bordeaux foram obtidas da vinícola B e cinco amostras da variedade Isabel foram obtidas da vinícola C. 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. A técnica de vinificação em tinto foi conduzida com remontagens diárias e contato das cascas e sementes com o suco por um período de seis dias, após o qual o mosto foi prensado e as amostras de bagaço coletadas. No transporte até o laboratório, as propriedades gerais dos bagaços foram mantidas pelo acondicionamento dos exemplares em caixas isotérmicas contendo gelo. No laboratório, as amostras de bagaço foram liofilizadas e armazenadas a -37 °C antes de serem analisadas.

3.2.3 Preparação dos extratos

Após trituração em nitrogênio líquido, as amostras em pó (1 g) foram extraídas com 50 mL de metanol acidificado (0,1% HCl) em equipamento Turrax (Metabo®, Nurthigen-Alemanha) por 1 h (4 x 15 min) em banho de gelo (~4 °C) e sob condições de penumbra. O extrato foi filtrado em papel filtro Whatman n°. 1 e analisado quanto ao conteúdo de compostos fenólicos totais, antocianinas monoméricas totais e atividade antioxidante. O rendimento da extração foi determinado como peso seco após secagem dos extratos em estufa a 105

°C até peso constante. Para a determinação de compostos fenólicos por HPLC, o solvente dos extratos filtrados foi completamente evaporado sob vácuo a 40 °C e os extratos secos foram redissolvidos com 10 mL de água ultra-pura. Uma alíquota de 5 mL do extrato foi aplicada em coluna SC6 (Macherey-Nagel GmbH e Co., Düren, Alemanha) contendo 1 g de poliamida, pré-condicionada com metanol (20 mL) e água (60 mL). A coluna foi lavada com água (20 mL), e em seguida eluída com metanol (50 mL) para a eluição de flavonóides de caráter neutro, e com metanol/amônia (99,5:0,5) (50 mL) para a eluição de flavonóides de caráter ácido. O solvente das frações eluídas foi completamente evaporado sob vácuo a 40 °C, e o material residual foi redissolvido com metanol (1 mL), filtrado com filtro de politetrafluoretileno (PTFE) (Millipore Ltd., Bedford, MA) de tamanho de poro 0,22 µm, e analisado por HPLC.

3.2.4 Conteúdo 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 foram expressos em mg equivalente a ácido gálico (GAE)/g em base seca (bs) de bagaço. 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.

3.2.5 Conteúdo de antocianinas totais

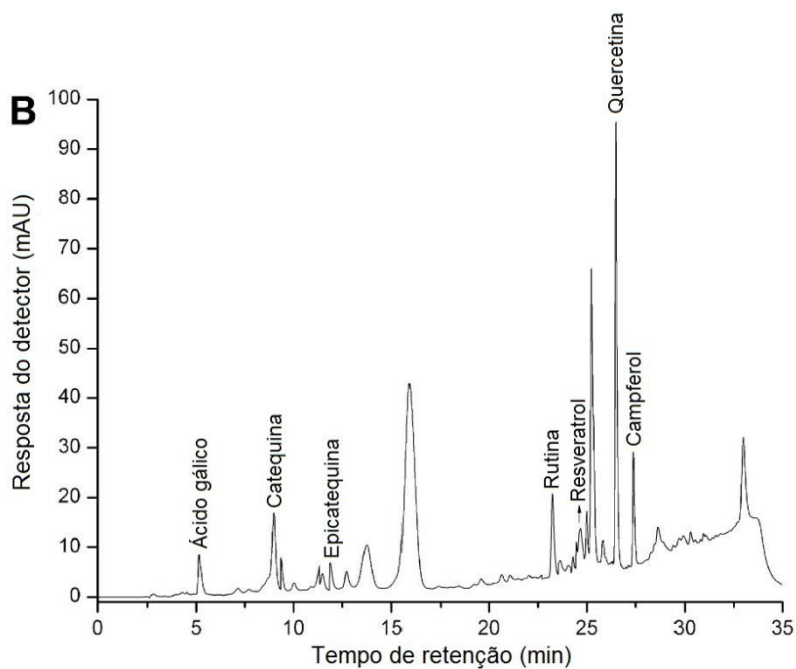
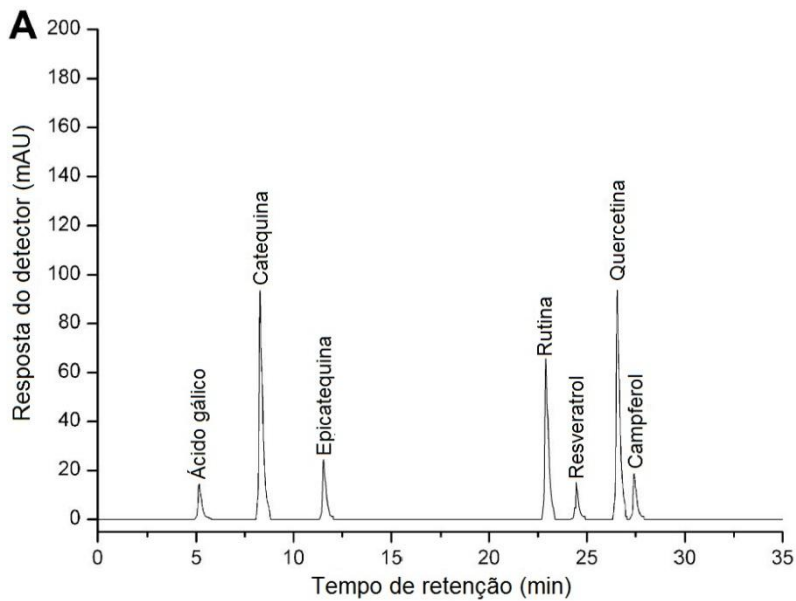
O conteúdo de antocianinas totais em cada extrato foi determinado pelo método de diferença de pH (GIUSTI; WROLSTAD, 2001). Os extratos foram diluídos para que a amostra atingisse uma absorbância entre 0,100 e 1,200 no comprimento de onda de 520 nm. Para uma alíquota de 0,2 mL de amostra diluída foram adicionados 1,8 mL da solução de cloreto de potássio (pH 1) em tubos de ensaio, homogeneizado e armazenado por 10 min em ausência de luz, sendo realizado procedimento equivalente com solução de acetato de sódio (pH 4,5). A absorbância foi medida nos comprimentos de onda de 520 e 700 nm, e o branco feito com água destilada. Os resultados foram

expressos em base seca (bs) de bagaço e apresentados como concentração (mg/g) de pigmentos monoméricos equivalentes a malvidina-3-glucosídeo (coeficiente de extinção molar de 28000 L/cm/mol e peso molecular de 463,3 g/mol).

3.2.6 Determinação de compostos fenólicos por HPLC

A identificação e a quantificação de compostos fenólicos foram realizadas de acordo com o método descrito por Arabbi, Genovese e Lajolo (2004) utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa, em equipamento modelo Hewlett-Packard 1100, com amostrador automático e bomba quaternária, acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD). Utilizou-se coluna de sílica em fase reversa (Phenomenex Ltd., Torrance, CA, USA), modelo Prodigy ODS3, com dimensões de 250 x 4,6 mm, e tamanho de partícula de 5 µm. Os solventes de eluição foram: A, consistindo da mistura de água:tetrahidrofurano:ácido trifluoracético (98:2:0,1); e B, metanol:tetrahidrofurano:ácido trifluoracético (98:2:0,1). O gradiente de solventes utilizado foi: 17% de B por 2 min, aumentando para 25% de B após 5 min, para 35% de B após mais 8 min e para 50% de B após mais 5 min. Aplicou-se um estágio de limpeza de coluna aumentando-se para 90% a proporção do solvente B após mais 5 min, e em seguida realizou-se o reequilíbrio do sistema aplicando-se 17% do solvente B por 20 min. Os eluatos foram monitorados nos comprimentos de onda de 270, 328, 370 e 525 nm, e as amostras foram injetadas em duplicata. A calibração foi realizada injetando-se os padrões três vezes em cinco diferentes concentrações. A identificação dos picos foi realizada pela comparação dos tempos de retenção e das características espectrais com os padrões e com os espectros armazenados na biblioteca do software. Um cromatograma típico dos padrões é apresentado na Figura 4. A quantificação dos derivados de quercetina e campferol foi realizada utilizando-se os padrões destes compostos na forma de agliconas, exceto no caso da rutina, para o qual foi utilizado o padrão de rutina. Os resultados foram expressos em mg/100 g de amostra em base seca (bs).

Figura 4 – Cromatograma da (A) mistura de padrões contendo ácido gálico, catequina, epicatequina, *t*-resveratrol, rutina, quercetina e campferol; e do (B) extrato de bagaço de uva da variedade Merlot (*Vitis vinifera* L.) (processado a 270 nm).



3.2.7 Determinação da atividade antioxidante – Método ABTS

O método ABTS foi aplicado de acordo com a metodologia descrita por Re et al. (1999). O radical ABTS•+ 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, em temperatura ambiente, durante 16 horas. Uma vez formado, o radical ABTS•+ foi diluído em etanol até obter-se uma medida de absorvância de 0,70 (\pm 0,02) em comprimento de onda de 734 nm. A absorvância foi medida a 734 nm, 7 min após a adição do extrato. Os resultados foram expressos em μ mol de capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC)/g em base seca (bs) de bagaço.

3.2.8 Determinação da atividade antioxidante – Método DPPH

O método DPPH foi aplicado de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). A queda na absorvância da solução do radical DPPH (100 μ M, 2,9 mL) dissolvido em metanol a 80% foi monitorada a 515 nm, 30 min após a adição de cada extrato. Os resultados também foram expressos em μ mol TEAC/g em base seca (bs) de bagaço.

3.2.9 Determinação do poder redutor – Método FRAP

Como descrito por Benzie e Strain (1996), o método FRAP é baseado na medida direta da habilidade dos antioxidantes (redutores) da amostra em reduzirem em meio ácido (pH 3,6) o complexo Fe³⁺/tripiridiltriazina (TPTZ) para formar Fe²⁺, de intensa cor azul. As amostras de extrato do bagaço de uva foram diluídas em água destilada, sendo acrescentado 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 min. 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 min, a absorvância foi medida em comprimento de onda de 620 nm. O valor do poder redutor foi calculado de acordo com a curva de calibração previamente preparada, sendo os resultados expressos em μ mol TEAC/g em base seca (bs) de bagaço.

3.2.10 Poder de inibição da oxidação - Método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico

O poder de inibição da oxidação foi avaliado pelo método de descoloramento do sistema β -caroteno/ácido linoléico descrito por Marco (1968). O mecanismo de descoloramento do β -caroteno é um fenômeno mediado por radicais livres resultantes da presença de hidroperóxidos formados a partir do ácido linoléico. Neste sistema modelo, o β -caroteno sofre rápida descoloração na ausência de um antioxidante. O radical livre do ácido linoléico, formado a partir da abstração de um átomo de hidrogênio de um de seus grupos metileno dialílicos, ataca as moléculas altamente insaturadas do β -caroteno. Como as moléculas de β -caroteno perdem suas duplas ligações por oxidação, o composto perde seu cromóforo e a cor alaranjada característica, o que pode ser monitorado espectrofotometricamente a 470 nm.

Uma alíquota de 20 μ L da solução de β -caroteno (20 mg/mL em clorofórmio) foi colocada em um frasco erlenmeyer de 250 mL com 40 μ 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 min). A emulsão apresentou-se límpida e sua absorbância a 470 nm foi ajustada para 0,6 a 0,7. Diferentes alíquotas (50, 100 e 200 μ L) dos extratos a 100 ppm foram comparadas ao controle (sem antioxidante) e ao BHT (butil hidroxitolueno), utilizado como antioxidante padrão. Uma leitura inicial da absorbância foi feita imediatamente após a adição das amostras e do padrão ao sistema visando à determinação do tempo zero. Posteriormente, a absorbância 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.

3.2.11 Análise estatística

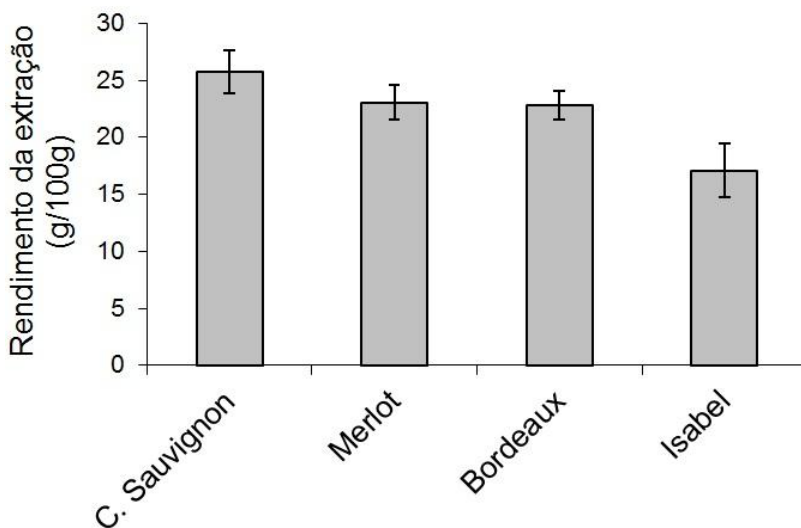
A análise dos dados foi realizada pela aplicação da ANOVA e o teste Tukey visando identificar diferenças significativas entre as médias, usando o software Statistica®, versão 7.0. O nível de significância considerado para a diferença entre as médias foi de 5% ($p < 0,05$). Foram analisadas cinco amostras de bagaço ($n = 5$) de cada variedade de uva, sendo todas as análises executadas em triplicata.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Rendimento da extração de sólidos solúveis, fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais

O rendimento das extrações de sólidos solúveis das amostras de bagaço de uva é apresentado na Figura 5. O extrato da variedade Cabernet Sauvignon apresentou maior conteúdo de sólidos solúveis (25,2 g/100 g). Não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os extratos das variedades Merlot e Bordeaux.

Figura 5 – Rendimento da extração de sólidos solúveis do bagaço de uva (média \pm intervalo de confiança, $p < 0,05$).



O conteúdo total de compostos fenólicos nos extratos apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre as variedades analisadas (Tabela 3), 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; ADSULE; BANERJEE, 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 mg/g) e Regente (49,73 mg/g),

produzidas na região de Videira, Santa Catarina, e avaliadas em um estudo anterior (ROCKENBACH et al., 2007).

Tabela 3 - 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^a (mg/g)	AMT^b (mg/g)	ABTS^c (μmol/g)	DPPH^c (μmol/g)	FRAP^c (μmol/g)
Cabernet	74,75	7,02	485,42	505,52	249,46
Sauvignon	(2,22) a	(0,32) b	(3,72) a	(4,62) a	(1,92) a
Merlot	46,23 (1,63) c	3,94 (0,14) c	318,16 (1,90) c	328,39 (3,15) c	169,19 (0,62) c
Bordeaux	63,31 (2,40) b	11,22 (0,50) a	355,06 (2,35) b	361,12 (2,89) b	208,43 (2,20) b
Isabel	32,62 (0,68) d	1,84 (0,06) d	193,36 (2,14) d	188,02 (2,50) d	117,79 (1,33) d

Valores em base seca (bs) de bagaço de uva expressos como média (desvio-padrão). n = 5.

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

^a Expresso em mg GAE/g (equivalente a ácido gálico).

^b Expresso em equivalente a malvidina-3-glicosídeo.

^c Expresso em 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 78,50 mg/g. Esse teor é superior aos teores observados em nosso estudo, com pequena diferença no caso da variedade Cabernet Sauvignon. Na Turquia, Bozan, Tosun e Özcan (2008) encontraram 103,7 e 105,7 mg/g de compostos fenólicos totais em sementes de uvas das variedades Cabernet Sauvignon e Merlot, respectivamente. Em outro estudo de Yemis, Bakkalbasi e Artik (2008) com sementes de uvas cultivadas também na Turquia, foram obtidos valores médios de fenólicos totais, em base seca, de 49,31 mg/g para cinco diferentes variedades de uvas brancas, e de 50,41 mg/g 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 superaram o conteúdo fenólico observado nos bagaços das variedades Cabernet Sauvignon e

Bordeaux. 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.

A Tabela 3 também apresenta o conteúdo de antocianinas monoméricas totais dos extratos, avaliado pelo método de diferença de pH. Foram observadas diferenças significativas entre os extratos ($p < 0,05$) e, diferentemente do conteúdo de fenólicos totais, o bagaço da variedade Bordeaux apresentou maior teor de antocianinas (11,22 mg/g), sendo seis vezes superior ao da variedade Isabel (1,84 mg/g). Pastrana-Bonilla et al. (2003) avaliaram antocianinas totais em casca de uva pelo método de diferença de pH e reportaram valores variando entre 4,85 a 10,86 mg/g em cinco diferentes cultivares de uva produzidas no sul da Geórgia. Considerando-se que o bagaço de uva pode ser utilizado como uma fonte para a extração de corantes naturais, o bagaço da variedade Bordeaux apresenta maior potencial para esta finalidade entre as variedades analisadas neste estudo.

3.3.2 Compostos fenólicos individuais

As amostras também foram analisadas por HPLC para a identificação de compostos fenólicos individuais nos extratos (Figura 4). Antocianinas, derivados de flavonóis (quercetina e campferol), catequina, epicatequina, *t*-resveratrol e ácido gálico foram detectados e quantificados (Tabela 4).

Os dados obtidos mostram diferenças nas concentrações de antocianinas totais de acordo com a variedade, como esperado. Os valores, que variam de 496,61 a 2917,50 mg/100 g, foram 2,1 a 2,7 vezes superiores aos valores de antocianinas monoméricas totais obtidos pelo método de diferença de pH. Esta tendência já foi descrita anteriormente por Lee, Rennaker e Wrolstad (2008), que utilizaram os métodos de diferença de pH e HPLC para a quantificação de antocianinas. Como descrito por estes autores, a HPLC em fase reversa acoplada a um detector de arranjo de diodos tem sido a técnica mais utilizada para a identificação e quantificação de antocianinas. Outro estudo, que avaliou antocianinas e flavonóis em bagaço de uva de diferentes variedades produzidas na Itália (RUBERTO et al., 2007) utilizando HPLC-UV-DAD e HPLC-ESI-MS, encontrou valores de antocianinas totais variando de 375 a 4527 mg/100 g.

Tabela 4 - Compostos fenólicos em extratos de bagaços de uvas tintas (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.).

Compostos Fenólicos	Cabernet Sauvignon	Merlot	Bordeaux	Isabel
Antocianinas ^a	1684,11 (22,76) b	827,49 (9,98) c	2917,50 (64,03) a	496,61 (5,89) d
Derivados de quercetina (exceto rutina)	13,98 (0,66) c	56,65 (0,22) a	9,18 (1,24) d	25,72 (0,35) b
Rutina	25,47 (0,84) b	41,43 (0,67) a	12,00 (0,10) c	26,39 (2,57) b
Derivados de campferol	nd	15,09 (0,12) a	nd	11,41 (0,51) b
Catequina	150,16 (0,91) a	122,29 (1,18) b	111,61 (1,79) c	94,28 (0,08) d
Epicatequina	18,24 (0,12) c	25,97 (0,57) b	nd	44,36 (0,14) a
<i>t</i> -resveratrol	4,02 (0,39) b	6,40 (0,20) a	nd	1,18 (0,08) c
Ácido gálico	4,59 (0,03) d	9,08 (0,04) c	18,68 (0,08) a	17,49 (0,02) b

Valores (mg/100 g) em base seca (bs) de bagaço de uva expressos como média (desvio-padrão). n = 5.

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

nd = não detectado.

^a Expresso em equivalente a malvidina-3-glicosídeo.

Em relação aos flavonóis quantificados nos extratos de bagaço de uva, as maiores concentrações de rutina, outros derivados de quercetina e derivados de campferol foram observadas para a variedade Merlot (41,43, 56,65 e 15,09 mg/100 g, respectivamente). A catequina, um composto flavanol monomérico, foi o composto não-antociânico identificado em maior concentração nos bagaços de uva analisados, atingindo valor de 150,16 mg/100 g. Em geral, como descrito por outros autores (MONTEALEGRE et al., 2006), o conteúdo fenólico no caso das sementes de uva consiste quase que exclusivamente de compostos flavan-3-ols como a catequina, o que pode explicar as concentrações

significativas observadas neste estudo. É importante destacar, porém, que outros compostos fenólicos, não quantificados devido à falta de padrões, estão presentes nas amostras de bagaço de uva, provavelmente a maioria formada por proantocianidinas, normalmente presentes na forma de oligômeros e polímeros de polihidroxi flavan-3-ols como a (+)-catequina e a (-)-epicatequina, e muitos na forma de ésteres de galato ou glicosídeos (BRANNAN, 2008).

A presença de *t*-resveratrol, quimicamente conhecido como trans-3,4,5'-trihydroxy-trans-estilbeno, já era esperada. Esta fitoalexina tem sido identificada em mais de 70 espécies de plantas, em uvas, amendoins, vinho tinto e amoras. As cascas de uva são, particularmente, ótimas fontes de resveratrol, com concentrações em torno de 50 a 100 µg/g nas cascas frescas, enquanto que nos vinhos tintos as concentrações de resveratrol variam em torno de 1,5 a 3 mg/L (BALIGA; KATIYAR, 2006). No presente estudo, foi possível detectar a presença de resveratrol no bagaço de três das quatro variedades de uva analisadas, com maior concentração (6,40 mg/100 g) na variedade Merlot. Estudos têm demonstrado que o resveratrol é um potente agente antimutagênico, antioxidante, antiinflamatório, e antiproliferativo, bem como um inibidor da ciclooxigenase e da hidropoxidase em diversos sistemas experimentais (JANG et al., 1997; AZIZ; KUMAR; AHMAD, 2003).

O ácido gálico, um composto não-flavonóide quantificado em todas as amostras de bagaço de uva, apresentou maior concentração na variedade Bordeaux (18,68 mg/100 g). A variação nas concentrações observada neste estudo é semelhante à relatada por outros autores (MONTEALEGRE et al., 2006; YILMAZ; TOLEDO, 2004).

3.3.3 Atividade antioxidante e poder redutor

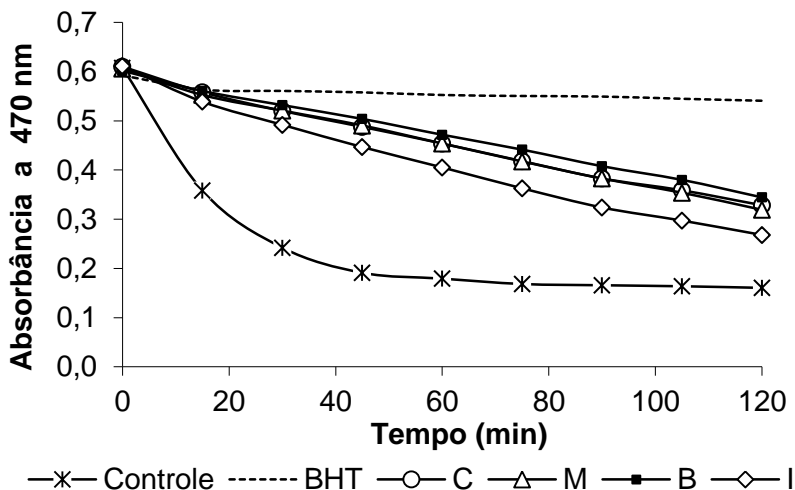
Com relação ao estudo da eficácia antioxidante, o uso de diferentes modelos *in vitro* tem sido recentemente recomendado devido às diferenças entre os vários sistemas analíticos de desativação de radicais livres (RUBERTO et al., 2007). Assim, a determinação da atividade antioxidante dos extratos de bagaço de uva foi efetuada pela aplicação dos métodos ABTS e DPPH, e o poder redutor foi avaliado pelo método FRAP (Tabela 3). A variedade Cabernet Sauvignon apresentou maior atividade antioxidante (485,42 e 505,52 µmol TEAC/g pelos métodos ABTS e DPPH, respectivamente) e maior poder redutor (249,46 µmol TEAC/g pelo método FRAP) na comparação com as demais variedades analisadas. Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram observadas entre as variedades. Em um estudo anterior onde foram

analisados bagaços de uvas tintas das variedades Regente e Pinot Noir (ROCKENBACH et al., 2007), foram obtidos valores médios de atividade antioxidante de 419 e 477 $\mu\text{mol TEAC/g}$ pelo método ABTS e 479 e 480 $\mu\text{mol TEAC/g}$ pelo método DPPH, respectivamente. No estudo de Pérez-Jiménez et al. (2008) foram reportados valores de atividade antioxidante (124,4 $\mu\text{mol TEAC/g}$ pelo método ABTS) para uvas tintas produzidas em Manzanares, na Espanha, menores do que os valores observados neste estudo. Já o valor de poder redutor foi maior (273,9 $\mu\text{mol TEAC/g}$ pelo método FRAP). Esta diferença pode ser atribuída aos potenciais redox dos compostos fenólicos individuais e suas propriedades estruturais, como o nível de hidroxilação e a extensão das conjugações (PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000). No estudo de Sánchez-Alonso et al. (2008), citado anteriormente, a fibra dietética obtida de bagaço de uva da variedade Airén apresentou atividade antioxidante de 284 $\mu\text{mol TEAC/g}$ pelo método ABTS, sendo este valor menor do que a maioria dos valores apresentados neste estudo.

3.3.4 Poder de inibição da oxidação

Além de apresentarem expressiva atividade antioxidante e poder redutor, os extratos de bagaço de uva também apresentaram moderada capacidade de inibir a oxidação no sistema modelo β -caroteno/ácido linoléico (Figura 6). Neste estudo, o mecanismo de descoloração do β -caroteno foi avaliado em um sistema mediado por radicais livres formados a partir do ácido linoléico. A presença dos extratos com atividade antioxidante pode inibir parcialmente a perda da cor do β -caroteno através da neutralização dos radicais livres formados no sistema, sendo o percentual de inibição da oxidação dose-dependente.

Figura 6 – Poder de inibição da oxidação de extratos de bagaço de uva e BHT a 100 mg/L no sistema β -caroteno/ácido linoléico. C = Cabernet Sauvignon; M = Merlot; B = Bordeaux; I = Isabel.



A ordem de poder de inibição da oxidação observada para os bagaços de uva analisados foi a seguinte: Bordeaux > Cabernet Sauvignon > Merlot > Isabel, com valores de 41,13, 35,56, 34,38 e 21,46%, respectivamente. Os resultados obtidos neste estudo indicam que o potencial dos extratos de bagaço de uva de inibir processos oxidativos em sistemas emulsionados deve ser explorado. A variedade Bordeaux, que apresentou a maior concentração de antocianinas, também apresentou o maior poder de inibição da oxidação, o que sugere que estes compostos possam estar diretamente relacionados com a capacidade dos extratos em desativar radicais livres liberados durante a oxidação do ácido linoléico.

3.4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo mostraram diferenças significativas entre as variedades em relação ao conteúdo de compostos fenólicos. As variedades Cabernet Sauvignon e Bordeaux apresentaram as maiores concentrações de fenólicos totais e antocianinas totais, respectivamente. A catequina foi o composto não-antociânico identificado em maiores concentrações nos bagaços de uva. A atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir do bagaço de uva apontou que, entre as variedades analisadas, a variedade Cabernet Sauvignon

apresenta maior potencial como fonte de compostos a serem aplicados como antioxidantes naturais em alimentos. A inibição da oxidação no sistema β -caroteno/ácido linoléico parece ser reforçada com o aumento no conteúdo de antocianinas.

4 COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE SEMENTE E CASCA DE BAGAÇO DE UVAS TINTAS (*Vitis vinifera* L. E *Vitis labrusca* L.) DA PRODUÇÃO DE VINHO NO BRASIL

Resumo

Este estudo teve como objetivo investigar o conteúdo de compostos fenólicos e a atividade antioxidante de cascas e sementes do bagaço da vinificação de uvas tintas largamente produzidas no Brasil para a produção de vinho, a fim de avaliar o seu potencial como fonte de antioxidantes naturais. Os teores de compostos fenólicos foram maiores nas sementes (2128 a 16518 mg equivalentes a catequina (CE)/100 g) do que nas cascas (660 a 1839 mg CE/100 g). Os maiores valores de atividade antioxidante determinada como habilidade de desativação de radicais livres DPPH e poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) foram encontrados para as sementes da variedade Pinot Noir (16925 μmol equivalentes ao Trolox (TEAC)/100 g e 21492 $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ /100 g, respectivamente) e para as cascas da variedade Isabel (3640 $\mu\text{mol TEAC}/100$ g e 4362 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/100$ g, respectivamente). As cascas das variedades Cabernet Sauvignon e Primitivo apresentaram as maiores concentrações de antocianinas (935 e 832 mg/100 g, respectivamente). Os extratos de semente de uva apresentaram elevadas concentrações de flavanóis oligoméricos e poliméricos. Os dados sugerem que os extratos de semente e casca de uva podem ser explorados como agentes antioxidantes.

Palavras-chave: Sementes e cascas de uva, compostos fenólicos, antocianinas, atividade antioxidante.

4.1 INTRODUÇÃO

A uva é uma das frutas mais cultivadas no mundo todo, e sua composição e propriedades têm sido extensivamente investigadas, com diversos relatos da presença de grandes quantidades de compostos fenólicos. A maioria dos compostos fenólicos encontrados no vinho pode atuar como antioxidantes. Da mesma forma, os subprodutos da vinificação também são caracterizados por elevados conteúdos de compostos fenólicos devido à extração insuficiente durante a vinificação (MACHEIX; FLEURIET; BILLOT, 1990; OSZMIANSKI; LEE, 1990; SOMERS; ZIEMELIS, 1985).

Os subprodutos obtidos após a vinificação, tanto as sementes como o bagaço, constituem uma fonte barata para a extração de compostos antioxidantes, proporcionando grande vantagem econômica (ALONSO et al., 2002; GONZÁLEZ-PARAMÁS et al., 2004). A composição (m/m) das sementes de uva é basicamente 40% fibras, 16% óleos essenciais, 11% proteínas, 7% compostos fenólicos complexos como taninos, açúcares, minerais e outras substâncias (CAMPOS et al., 2008). A casca de uva é uma fonte de antocianidinas e antocianinas, pigmentos naturais com propriedades antioxidantes que atuam na inibição da lipoperoxidação e que possuem atividade antimutagênica (PEDRESCHI; CISNEROS-ZEVALLOS, 2006). A maior parte do bagaço formado a partir da produção de vinho no Brasil, aproximadamente 59,4 milhões de toneladas de bagaço considerando-se 18 kg de bagaço/100 L de vinho, é tratada como resíduo de baixo valor econômico e utilizada como ração animal e esterco. Portanto, estudos acerca do aproveitamento deste resíduo como um subproduto de valor agregado poderiam representar ganhos econômicos significativos e prevenir ou diminuir os problemas ambientais causados pela acumulação do bagaço da vinificação (CAMPOS et al., 2008).

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 obtidos de bagaço e sementes de uva têm sido utilizados como antioxidantes naturais (JAYAPRAKASHA; SINGH; SAKARIAH, 2001; MURTHY; SINGH; JAYAPRAKASHA, 2002; REVILLA; RYAN, 2000), tendo em vista seu elevado conteúdo de compostos fenólicos monoméricos como (+)-catequina, (-)-epicatequina e (-)-epicatequina-3-O-galato, e proantocianidinas diméricas, triméricas e tetraméricas (SAITO et al., 1998). Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o conteúdo de compostos fenólicos e a atividade antioxidante *in vitro* de extratos de semente e casca de bagaços de uvas tintas da produção de vinho no Brasil, a fim de avaliar o seu potencial como fonte de antioxidantes naturais.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Amostras e reagentes

Três amostras de aproximadamente 2 kg cada uma de bagaço da vinificação de uvas tintas foram obtidas através da Estação Experimental da EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina), oriundas da região de Videira, Santa Catarina, da safra 2009. Foram utilizadas amostras de bagaço das variedades Sangiovese, Primitivo, Pinot Noir, Negro Amaro e Cabernet Sauvignon da espécie *Vitis vinifera* L.; e da variedade Isabel, espécie *Vitis labrusca* L. As amostras congeladas e armazenadas em caixas isotérmicas foram transportadas ao laboratório de Química de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC.

Os reagentes catequina, epicatequina, ácido clorogênico, quercetina, campferol, *t*-resveratrol, rutina, cianidina-3-rutinosídeo, Folin-Ciocalteu, carbonato de sódio, 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico (Trolox) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). 2,4,6-Tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) foi adquirido da Fluka Chemie AG (Buchs, Suíça). Para as extrações e para a HPLC foram utilizados solventes de grau analítico/HPLC adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

4.2.2 Preparo de extratos

De cada amostra de bagaço de uva foram separadas manualmente cascas e sementes, que foram analisadas separadamente. As amostras de casca e semente de todas as variedades foram liofilizadas e posteriormente trituradas com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó. As amostras em pó (1 g) foram então extraídas com 50 mL de uma mistura de solventes metanol/água/ácido acético (80:20:5) por agitação mecânica durante 1 h, na ausência de luz, e em temperatura de 4 °C. Os extratos foram filtrados com papel filtro (Whatman n°. 1) e analisados quanto ao teor de compostos fenólicos totais, flavanóis totais e atividade antioxidante.

Para a determinação de compostos fenólicos por HPLC, o solvente dos extratos filtrados foi completamente evaporado sob vácuo a 40 °C em rotaevaporador, e os extratos secos foram redissolvidos com 10 mL de água ultra-pura. Uma alíquota de 5 mL do extrato foi aplicada em coluna SC6 (Macherey-Nagel GmbH and Co, Düren, Alemanha) contendo 1 g de poliamida, pré-condicionada com metanol (20 mL) e água (60 mL). A coluna foi lavada com água (20 mL), e em seguida eluída com metanol (50 mL) para a eluição de flavonóides de caráter neutro, e com metanol/amônia (99,5:0,5) (50 mL) para a eluição de

flavonóides de caráter ácido. O solvente das frações eluídas foi completamente evaporado nas condições descritas anteriormente, e o material residual foi redissolvido com metanol (1 mL), filtrado com filtro de politetrafluoretileno (PTFE) (Millipore Ltd., Bedford, MA, USA) de tamanho de poro 0,22 μm , e analisado por HPLC.

4.2.3 Compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com Genovese et al. (2008). Uma alíquota de 0,25 mL do extrato foi misturada a 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 2 mL de água destilada. Após 3 min em temperatura ambiente, adicionou-se 0,25 mL de uma solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3), e a mistura foi mantida a 37 °C por 30 min. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 750 nm utilizando-se espectrofotômetro UV/Visível (Ultrospec 2000, Amersham Biosciences, Cambridge, UK). Os resultados foram expressos em mg equivalentes a catequina (CE)/100 g de amostra em base seca (bs).

4.2.4 Flavanóis totais

A determinação de flavanóis totais foi realizada colorimetricamente pelo método da vanilina, utilizando-se a catequina como padrão (PRICE; SCOYOC; BUTLER, 1978). Neste procedimento, foram adicionados 5 mL do reagente vanilina (0,5 g do reagente e 200 mL de metanol/HCl 4%) a 1 mL de cada extrato metanólico dos subprodutos da vinificação, sendo a mistura completamente homogeneizada. De forma similar, foi preparado um branco pela adição de 5 mL da solução metanol/HCl 4% a 1 mL de cada extrato metanólico dos subprodutos da vinificação. As absorbâncias das amostras e do branco foram medidas espectroscopicamente em comprimento de onda de 500 nm após 20 min de reação na ausência de luz e temperatura de 27 °C. O valor de absorbância do branco foi subtraído do valor de absorbância das amostras e os resultados foram expressos em mg equivalentes a catequina (CE)/100 g de amostra em base seca (bs).

4.2.5 Determinação de compostos fenólicos por HPLC

A identificação e a quantificação de compostos fenólicos individuais foram realizadas utilizando-se a técnica de HPLC em fase

reversa, em equipamento modelo Hewlett-Packard 1100, com amostrador automático e bomba quaternária, acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD). Foi utilizada coluna de sílica em fase reversa (Phenomenex Ltd., Torrance, CA, USA), modelo Prodigy ODS3, com dimensões de 250 x 4,6 mm (diâmetro interno), e tamanho de partícula de 5 µm. Os solventes de eluição foram: A, consistindo da mistura de água/tetrahidrofurano/ácido trifluoracético (98:2:0,1); e B, metanol/tetrahidrofurano/ácido trifluoracético (98:2:0,1). O gradiente de solventes foi aplicado de acordo com Genovese et al. (2008). Os eluatos foram monitorados a 270, 328, 370 e 525 nm, e as amostras foram injetadas em duplicata. A calibração foi realizada injetando-se os padrões três vezes em cinco diferentes concentrações. A identificação dos picos foi realizada pela comparação dos tempos de retenção e das características espectrais com os padrões e com os espectros armazenados na biblioteca do software. Os resultados foram expressos em mg/100 g de amostra em base seca (bs).

4.2.6 Atividade antioxidante de desativação de radicais DPPH

A determinação da atividade antioxidante de desativação de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) foi realizada de acordo com Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com algumas modificações (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Alíquotas de 50 µL dos extratos previamente diluídos e de 250 µL do radical DPPH (0,5 mM) foram misturadas com agitação, e, após 25 min, mediu-se a absorbância da mistura em comprimento de onda de 517 nm, utilizando-se espectrofotômetro de microplacas (Benchmark Plus, Biorad, Hercules, CA, USA). O controle consistiu de uma solução metanólica de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico) em diferentes concentrações. A atividade antioxidante foi expressa em µmol equivalentes ao Trolox (TEAC)/100 g de amostra em base seca (bs).

4.2.7 Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)

O teste do poder antioxidante de redução do ferro foi conduzido de acordo com Benzie e Strain (1996). A solução tampão de acetato (0,3 M, pH 3,6) foi preparada pela dissolução de 3,1 g de $C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$ e 16 mL de ácido acético em 1 L de água destilada. A solução de TPTZ (2,4,6-Tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) foi preparada pela dissolução de 23,4 mg de TPTZ em 7,5 mL de solução de HCl 40 mM. A solução de ferro (20 mM) foi preparada a partir de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$. O reagente final para

análise foi preparado pela mistura das soluções de tampão acetato, TPTZ e ferro na proporção de 10:1:1, e aquecido a 37 °C. Alíquotas (200 µL) de cada extrato foram misturadas com 1,8 mL do reagente FRAP e a absorbância da mistura foi medida a 593 nm após incubação a 37 °C por 10 min. Soluções-padrão aquosas de FeSO₄.7H₂O (0-1000 µmol/L) foram utilizadas para a obtenção da curva de calibração. Os resultados foram expressos em µmol de Fe²⁺/100 g de amostra em base seca (bs).

4.2.8 Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média ± desvio-padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software *Statistica*, versão 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Diferenças entre médias foram analisadas através de análise de variância (ANOVA) e do teste de Tukey (p<0,05).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Compostos fenólicos totais, flavanóis totais e atividade antioxidante

A Tabela 5 apresenta o conteúdo total de compostos fenólicos dos extratos de semente e casca de uva. Como esperado, para todas as variedades analisadas foram observadas concentrações superiores de compostos fenólicos nas sementes em comparação com as cascas. As variedades Pinot Noir e Isabel apresentaram a menor e a maior concentração de compostos fenólicos nas cascas, com valores de 660 e 1839 mg CE/100 g bs, respectivamente, enquanto o contrário foi observado para as sementes, com valores de 16518 e 2128 mg CE/100 g bs, respectivamente. Variações significativas nos níveis de compostos fenólicos em sementes (330-870 mg de compostos flavan-3-ols/kg de uva fresca) e cascas (130-200 mg de compostos flavanóis/kg de uva fresca) de diferentes variedades de uvas tintas foram reportadas anteriormente (MONTEALEGRE et al., 2006), e foram atribuídas a diversos fatores, incluindo o clima, grau de maturação, tamanho da baga e variedade. Koundouras et al. (2009) investigaram a importância da irrigação e os efeitos de porta-enxertos na concentração de compostos fenólicos de uvas Cabernet Sauvignon. De acordo com seus experimentos, a limitação de água provocou um aumento substancial na concentração de antocianinas das cascas, sendo a malvidina-3-glicosídeo

a mais afetada pela limitação de água. O regime de irrigação e o genótipo do porta-enxerto também afetaram o conteúdo total de compostos flavan-3-ols monoméricos nos tecidos das sementes, principalmente como resultado de variações no conteúdo de catequina. As altas concentrações de compostos fenólicos e a variação destas concentrações entre diferentes variedades de uva demonstram a importância do estudo dos subprodutos da vinificação como uma fonte destes compostos.

Tabela 5 - Fenólicos totais, flavanóis totais, atividade antioxidante de desativação de radicais DPPH e poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) de extratos de casca e semente de uva (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.).

Parâmetro		Pinot Noir	Isabel	Sangiovese	Negro Amaro	Cabernet Sauvignon	Primitivo
Fenólicos Totais ^a	Casca	660 (5) e	1839 (11) a	750 (12) d	686 (8) e	1065 (17) c	1328 (1) b
	Semente	16518 (98) a	2128 (19) f	7682 (29) d	7237 (96) e	8249 (125) c	8963 (33) b
Flavanóis Totais ^a	Casca	56 (13) d	156 (25) b,c	206 (13) a,b	131 (33) c	252 (26) a	165 (19) b,c
	Semente	11187 (250) a	1188 (125) e	6812 (331) b	4521 (191) d	5312 (125) c	5729 (72) c

DPPH ^b	<i>Casca</i>	1113 (40) f	3640 (63) a	1466 (18) d	1305 (72) e	2032 (46) c	2897 (60) b
	<i>Semente</i>	16925 (189) a	2694 (32) e	8144 (114) b	7265 (95) d	8281 (146) b	7795 (91) c
FRAP ^c	<i>Casca</i>	1454 (4) f	4362 (17) a	1785 (11) d	1627 (11) e	2441 (9) c	3474 (12) b
	<i>Semente</i>	21492 (47) a	2942 (37) e	10588 (61) b	9447 (49) c	10591 (56) b	9262 (35) d

Valores expressos como média (desvio-padrão). n = 3.

Médias na mesma coluna seguidas por letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa (p<0,05).

^a mg equivalente à catequina (CE)/100 g bs.

^b μmol de capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC)/100 g bs.

^c μmol de Fe²⁺/100 g bs.

O conteúdo total de flavanóis monoméricos e oligoméricos foi estimado pelo método da vanilina-HCl e descrito como flavanóis totais (Tabela 5). A tendência dos dados foi similar a do conteúdo de fenólicos totais dos extratos das sementes. A variedade Pinot Noir apresentou o maior conteúdo de flavanóis totais (11187 mg CE/100 g bs). Dentre os extratos das cascas de uva esta tendência não foi observada, e a variedade Cabernet Sauvignon apresentou o maior conteúdo de flavanóis totais (252 mg CE/100 g bs). Os dados observados são consistentes com os dados de outros estudos realizados com variedades de uva produzidas em diferentes regiões do mundo (NEGRO; TOMMASI; MICELI, 2003; BOZAN; TOSUN; ÖZCAN, 2008) e confirmam que os extratos de semente de uva analisados são ricos em proantocianidinas, que normalmente estão presentes na forma de oligômeros e polímeros de polihidroxi-flavan-3-ols como a (+)-catequina

e a (-)-epicatequina, a maioria deles na forma de ésteres de galato ou glicosídeos (BRANNAN, 2008).

A atividade antioxidante dos extratos de casca e semente de uva determinada como habilidade de desativação de radicais DPPH variou de 1113 a 3640, e de 2694 a 16925 $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g bs}$, respectivamente (Tabela 5). O maior valor de atividade antioxidante foi observado para a variedade Pinot Noir dentre as sementes analisadas e para a variedade Isabel dentre as cascas. Foram observadas altas correlações positivas entre o conteúdo total de compostos fenólicos e a habilidade de desativação de radicais DPPH tanto para os extratos de cascas ($r = 0,991$) quanto para os extratos de sementes ($r = 0,990$). Correlações positivas entre compostos fenólicos e atividade antioxidante têm sido descritas na literatura por diversos autores (ALONSO et al., 2002; LOULI; RAGOUSIS; MAGOULAS, 2004; BARTOLOMÉ et al., 2004; ROCKENBACH et al., 2007). Em termos gerais, observou-se que a atividade antioxidante foi superior nos extratos de semente de uva em comparação com os extratos de casca, o que pode ser explicado pelo conteúdo total de compostos fenólicos e também pelo fato de que as sementes de uva são ricas em flavanóis galoilados, compostos que têm atividade antioxidante superior em meio aquoso em comparação com seus homólogos não-galoilados (GONZÁLEZ-PARAMÁS et al., 2004). Também foi observada uma alta correlação positiva ($r = 0,975$) entre o conteúdo de flavanóis totais dos extratos de semente de uva e sua atividade antioxidante determinada pelo método DPPH. Uma alta correlação positiva semelhante foi observada em um estudo onde foram avaliados a capacidade antioxidante e o conteúdo fenólico de vinhos franceses (LANDRAULT et al., 2001), e no qual os vinhos da variedade Pinot Noir apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante e conteúdo de catequina.

A atividade antioxidante dos extratos de casca e semente de uva determinada como poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) variou de 1454 a 4362, e de 2942 a 21492 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/100 \text{ g bs}$, respectivamente (Tabela 5). Os resultados do método FRAP seguiram a mesma tendência dos resultados obtidos no método DPPH, com os maiores valores de atividade antioxidante observados para as sementes da variedade Pinot Noir e para as cascas da variedade Isabel. A correlação entre os dados obtidos pelos métodos DPPH e FRAP foi extremamente significativa ($r = 0,999$), tendo sido mencionada também no estudo de Katalinić et al. (2010) que analisaram o perfil polifenólico e as propriedades antioxidantes de extratos de casca de uva de 14 variedades *Vitis vinifera* produzidas na região da Dalmácia (Croácia).

Ambos os métodos são baseados no mesmo mecanismo de ação, ou seja, transferência de elétrons, o que pode explicar a correlação observada (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Em nosso estudo, altas correlações positivas também foram observadas entre o conteúdo total de compostos fenólicos e o poder antioxidante de redução do ferro das cascas ($r = 0,992$) e das sementes ($r = 0,984$), e entre o conteúdo total de flavanóis dos extratos de semente de uva e a atividade antioxidante destes extratos determinada pelo método FRAP ($r = 0,976$).

4.3.2 Compostos fenólicos por HPLC

Todas as amostras foram analisadas por HPLC para a quantificação de diferentes compostos fenólicos, incluindo antocianinas, derivados de flavonóis (quercetina e campferol), os flavanóis monoméricos catequina e epicatequina, *t*-resveratrol e ácido clorogênico. Os resultados são apresentados na Tabela 6 (cascas) e Tabela 7 (sementes). Os dados obtidos mostram diferença nas concentrações de antocianinas totais (Tabela 6) de acordo com a variedade. As variedades Cabernet Sauvignon e Primitivo apresentaram os maiores teores de antocianinas totais (935 e 832 mg/100 g bs, respectivamente), sendo estes teores duas vezes superiores aos teores encontrados nas cascas das demais variedades analisadas. Em outro estudo, que avaliou o conteúdo de antocianinas e flavonóis em amostras de bagaço de uva de cinco cultivares (Nero d'Avola, Nerello Mascalese, Nerello Cappuccio, Frappato e Cabernet Sauvignon) da região da Sicília, na Itália (RUBERTO et al., 2007), foram encontrados teores de antocianinas totais variando de 375 a 4527 mg/100 g.

Em relação aos flavonóis quantificados, a rutina e os demais derivados de quercetina foram detectados nas cascas de todas as variedades analisadas. As maiores concentrações de flavonóis foram encontradas nas cascas das variedades Sangiovese e Negro Amaro considerando-se derivados de quercetina (39,05 e 40,03 mg/100 g bs, respectivamente) e campferol (14,10 e 14,89 mg/100 g bs, respectivamente), e nas cascas da variedade Sangiovese considerando-se apenas a rutina (57,04 mg/100 g bs). Nos extratos das sementes, pequenas quantidades de flavonóis foram encontradas, sendo que nem todos os extratos obtidos a partir das sementes continham flavonóis dentre os compostos quantificados. Entre os flavanóis monoméricos, a catequina apresentou as maiores concentrações nas sementes das variedades analisadas (24,12-117,00 mg/100 g bs), com exceção da

variedade Pinot Noir, na qual a epicatequina apresentou a maior concentração (47,50 mg/100 g bs).

Tabela 6 - Compostos Fenólicos de cascas de uva (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.) identificados por HPLC.

Compostos Fenólicos	Pinot Noir	Isabel	Sangiovese	Negro Amaro	Cabernet Sauvignon	Primitivo
Antocianinas ^a	385,93 (5,67) d	456,52 (1,31) c	301,57 (0,23) e	289,46 (7,05) e	934,67 (10,09) a	831,92 (2,77) b
Rutina	14,95 (0,01) f	19,44 (1,35) e	57,04 (1,80) a	29,75 (0,22) c	25,91 (0,14) d	47,51 (0,03) b
Derivados de quercetina (exceto rutina)	15,19 (0,02) d	17,96 (0,74) c	39,05 (0,07) a	40,03 (0,03) a	22,86 (0,08) b	22,34 (0,56) b
Derivados de campferol	5,18 (0,01) c	nd	14,10 (0,02) a	14,89 (0,65) a	nd	10,14 (0,75) b
Catequina	13,20 (1,81) a	nd	10,07 (0,16) b	nd	nd	nd
Epicatequina	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>t</i> -resveratrol	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ácido clorogênico	5,30 (0,09) d	23,11 (0,51) a	4,05 (0,72) d	8,37 (0,02) c	nd	15,15 (0,88) b

Valores, em mg/100 g bs, são expressos como média (desvio-padrão). n = 3.

Médias na mesma linha seguidas por letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa (p<0,05).

nd = não detectado.

^a Equivalente à cianidina-3-rutinosídeo.

Tabela 7 - Compostos Fenólicos de sementes de uva (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.) identificados por HPLC.

Compostos Fenólicos	Pinot Noir	Isabel	Sangiovese	Negro Amaro	Cabernet Sauvignon	Primitivo
Rutina	nd	nd	2,57 (0,16) d	5,10 (0,51) c	9,05 (0,11) a	7,08 (0,40) b
Derivados de quercetina (exceto rutina)	nd	nd	2,65 (0,12) b	3,68 (0,36) a	nd	2,35 (0,09) b
Derivados de campferol	nd	nd	1,50 (0,13) a	nd	nd	1,53 (0,07) a
Catequina	27,45 (0,37) e	24,12 (0,37) f	61,52 (0,16) d	117,00 (1,25) a	88,45 (0,47) b	75,16 (0,84) c
Epicatequina	47,50 (0,65) a	17,78 (0,14) b	nd	nd	nd	nd
<i>t</i> -resveratrol	nd	3,75 (0,08) a	1,11 (0,02) c	1,42 (0,07) b	nd	1,32 (0,11) b,c
Ácido clorogênico	3,50 (0,16) d	4,62 (0,02) b,c	4,29 (0,06) c	4,71 (0,13) b	2,87 (0,01) e	6,80 (0,05) a

Valores, em mg/100 g bs, são expressos como média (desvio-padrão). n = 3.

Médias na mesma linha seguidas por letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

nd = não detectado.

Radovanović, Radovanović e Souquet (2010) analisaram o perfil fenólico de vinhos Cabernet Sauvignon de oito diferentes regiões dos Balcãs e demonstraram que os conteúdos de compostos fenólicos variam dependendo dos fatores agroclimáticos e das práticas enológicas da região vinícola. Com base nos resultados, os autores propuseram que as concentrações dos principais componentes, catequina e quercetina,

podem ser utilizadas como marcadores bioquímicos para a autenticação de cultivares de uvas tintas.

A presença de *t*-resveratrol, quimicamente conhecido como *trans*-3,4,5'-trihydroxy-*trans*-estilbeno, já era esperada. Esta fitoalexina tem sido identificada em mais de 70 espécies de plantas, em uvas, amendoins, vinho tinto e amoras. As cascas de uva são, particularmente, ótimas fontes de resveratrol, com concentrações em torno de 50 a 100 µg/g nas cascas frescas, enquanto que nos vinhos tintos as concentrações de resveratrol variam em torno de 1,5 a 3 mg/L (BALIGA; KATIYAR, 2006). Diversos estudos sobre as propriedades bioativas do resveratrol e seus derivados têm sido publicados recentemente, e os resultados mostram que o resveratrol é um potente agente antimutagênico, antioxidante, anti-inflamatório e antiproliferativo, bem como um inibidor da ciclooxigenase e hidroperoxidase em diversos sistemas experimentais (JANG et al., 1997; AZIZ; KUMAR; AHMAD, 2003). As amostras de cascas analisadas neste estudo são subprodutos obtidos das uvas após a vinificação, desta forma acredita-se que o resveratrol possa ter sido transferido para o vinho ao ponto de estar presente em concentrações abaixo do limite de detecção do método utilizado. No caso das sementes, a transferência deste composto para o vinho é inibida ou diminuída devido ao fato de as sementes permanecerem intactas, tendo sido possível quantificar os teores de resveratrol nas sementes (1,11-3,75 mg/100 g bs) de quatro das seis variedades de uva avaliadas. Um teor semelhante de *t*-resveratrol (1,42 mg/100 g bs) foi encontrado nas sementes da variedade de uva Weisser Riesling no estudo de Kammerer et al. (2004). Careri et al. (2003) relataram valores de 0,89 e 3,25 mg de *trans*-resveratrol/100 g em bagaço e casca de uva, respectivamente, da cultivar Nero d'Avola.

Outro composto fenólico detectado e quantificado nos extratos de semente e casca de uva foi o ácido clorogênico, um éster do ácido cafeico e ácido quínico que é considerado um polifenol abundante na dieta humana, sendo encontrado principalmente em café, frutas e vegetais. A biodisponibilidade e as propriedades antioxidantes do ácido clorogênico têm sido estudadas (GONTHIER et al., 2003). O ácido clorogênico foi detectado e quantificado em todos os extratos de semente e casca de uva analisados neste estudo, exceto o extrato de casca de uva da variedade Cabernet Sauvignon. A casca da variedade Isabel apresentou o maior teor de ácido clorogênico (23,11 mg/100 g bs). Alguns vinhos tintos brasileiros produzidos a partir de uma cultivar de uva híbrida (Isabel) foram recentemente analisados para determinar sua capacidade antioxidante e composição fenólica (NIXDORF;

HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010), e uma baixa concentração de flavonóis e elevada concentração de derivados de ácidos hidroxicinâmicos foram observadas em comparação com outros vinhos tintos produzidos a partir de cultivares *Vitis vinifera*. Em outro estudo, Hogan et al. (2009) relataram valores de 0,21 e 0,33 mg de ácido clorogênico/100 g de amostra fresca para dois diferentes clones da variedade de uva Cabernet Franc.

A análise estatística de todas as amostras analisadas revelou que não há correlação entre os compostos fenólicos específicos identificados por HPLC e a atividade antioxidante destas amostras, o que indica que a atividade antioxidante está relacionada com o conteúdo total de compostos fenólicos e, particularmente, com o conteúdo de flavanóis oligoméricos e poliméricos, uma vez que alguns compostos fenólicos contribuem mais do que outros para a atividade antioxidante total medida para cada tipo de amostra.

4.4 CONCLUSÕES

Os extratos de semente e casca de uva analisados apresentam elevado conteúdo de compostos fenólicos totais e elevada atividade antioxidante, estando estes parâmetros significativamente correlacionados ($p < 0,05$). Os extratos de semente de uva, que apresentam conteúdo de fenólicos totais superior ao dos extratos de casca, são ricos em flavanóis, especialmente compostos oligoméricos e poliméricos com elevada atividade antioxidante. Os resultados também confirmam as cascas de uva como fonte potencial para a extração de antocianinas, e sugerem que, embora as diferenças no conteúdo total de polifenóis e atividade antioxidante entre as variedades analisadas foram significativas, as concentrações de compostos fenólicos totais observadas são suficientemente elevadas para tornar a extração de polifenóis deste subproduto um processo economicamente viável.

5 PERFIL DE COMPOSTOS FLAVAN-3-OL GALOILADOS E NÃO-GALOILADOS E INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE ENANTIÔMEROS DE CATEQUINA E EPICATEQUINA EM SEMENTES DE BAGAÇOS DE UVAS TINTAS (*Vitis vinifera* E *Vitis labrusca*) DA PRODUÇÃO DE VINHO NO BRASIL

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de compostos flavan-3-ol galoilados e não-galoilados e a presença de enantiômeros de catequina e epicatequina em sementes de bagaços da vinificação de variedades de uva largamente produzidas no Brasil, a fim de avaliar o seu potencial de exploração como uma fonte de antioxidantes naturais. As análises por eletroforese capilar utilizando seletor quiral mostraram que as condições do processo de fermentação da produção de vinho não deram origem aos enantiômeros (-)-catequina e (+)-epicatequina. Somente (+)-catequina e (-)-epicatequina puderam ser identificadas. As análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com um detector de arranjo de diodos e um espectrômetro de massas (HPLC-ESI-MSⁿ) mostraram a presença de diversos compostos flavan-3-ol galoilados e não-galoilados e a presença de produtos condensados de catequina com acetaldeído, tentativamente identificados como dímeros e trímeros de etil-(epi)catequina. Oligômeros com até 4 unidades monoméricas puderam ser detectados. Os dados obtidos sugerem que as sementes de uva, especialmente da variedade Pinot Noir, podem ser exploradas como fonte de agentes antioxidantes.

Palavras-chave: Sementes de uva, subprodutos da vinificação, flavan-3-ols, procianidinas, enantiômeros.

5.1 INTRODUÇÃO

O bagaço de uva, um resíduo industrial da produção de vinho, tem sido reconhecido como uma importante e pouco explorada fonte de polifenóis. Os polifenóis do bagaço de uva são principalmente antocianinas, flavonóis, flavanóis, ácidos fenólicos e resveratrol. Diversos estudos têm relatado a atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva, sugerindo os subprodutos da vinificação como uma fonte para a produção de antioxidantes naturais (BOUSSETTA et al., 2011; ROCKENBACH et al., 2011a; ROCKENBACH et al., 2011b).

A produção de vinho no Brasil atingiu cerca de 220 milhões de litros em 2010 (UVIBRA, 2011). Considerando-se a formação de 20 kg

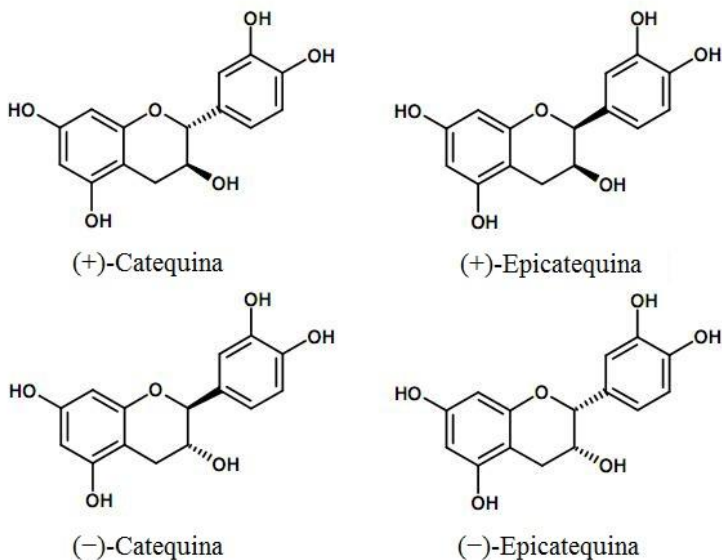
de bagaço de uva para cada 100 L de vinho produzido, aproximadamente 44 milhões de kg de bagaço são gerados anualmente. A maior parte deste subproduto é tratada como resíduo com baixo valor econômico e subutilizada. Portanto, estudos acerca do aproveitamento deste resíduo como um subproduto de valor agregado poderiam representar ganhos econômicos significativos e prevenir ou diminuir os problemas ambientais causados pela acumulação do bagaço da vinificação (CAMPOS et al., 2008).

As sementes constituem uma considerável porção do bagaço de uva, respondendo por cerca de 38 a 52% do volume total em base seca (GHAFOOR et al., 2009). A composição das sementes de uva é basicamente (m/m) 40% fibras, 16% óleo essencial, 11% proteína, 7% compostos fenólicos complexos como taninos, e outras substâncias como açúcares e minerais (CAMPOS et al., 2008). Em sementes de uva, as proantocianidinas representam, em geral, a maior parte do extrato polifenólico total, e sua extrema complexidade é o resultado do grande número de compostos diferentes com estruturas muito similares. Elas são, de fato, compostas por unidades de flavan-3-ols, (+)-catequina e (-)-epicatequina, unidas por ligações C4-C6 e C4-C8, e várias esterificações galato (DE FREITAS et al., 1998). As proantocianidinas oligoméricas são formadas por dois ou mais monômeros. As proantocianidinas diméricas são frequentemente mencionadas como série B, enquanto que as proantocianidinas triméricas como série C. Oito diferentes dímeros (procianidinas B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7 e B8) e dois trímeros (C1 e C2) foram identificados em sementes e cascas de uvas (DE FREITAS et al., 1998; NAWAZ et al., 2006).

Os compostos flavan-3-ol possuem dois centros quirais, localizados nas posições C2 e C3 do anel C. Devido à via biossintética dos flavonóides nas plantas, predominantemente (+)-catequina e (-)-epicatequina são sintetizadas (Figura 7). (-)-Catequina e (+)-epicatequina são raramente encontradas na natureza. *In vitro*, a (-)-catequina e a (+)-epicatequina puderam ser formadas através de epimerização da (+)-catequina e da (-)-epicatequina em solução aquosa aquecida ou meio alcalino (KOFINK; PAPAGIANNPOULOS; GALENSA, 2007a). Considerando-se o processamento de alimentos, grãos de cacau torrados e produtos de cacau apresentaram o atípico composto flavan-3-ol (-)-catequina. Neste caso, os autores descrevem que altas temperaturas durante o processo de torrefação do grão de cacau e particularmente a alcalinização do pó de cacau são os principais fatores na indução da reação de epimerização (KOFINK; PAPAGIANNPOULOS; GALENSA, 2007b; RITTER;

ZIMMERMANN; GALENSA, 2010). Para o processo de fabricação do vinho, no entanto, ao nosso conhecimento, nenhuma publicação em relação à presença de enantiômeros de catequina e epicatequina em sementes de uvas obtidas do bagaço da vinificação está disponível na literatura.

Figura 7 – Estrutura química básica dos enantiômeros de catequina e epicatequina.



Em uma publicação anterior, nós já apresentamos alguns compostos fenólicos e a atividade antioxidante de extratos de sementes e cascas do bagaço da vinificação de variedades de uva largamente produzidas no Brasil (ROCKENBACH et al., 2011a). Como parte de nossos esforços para promover a utilização do bagaço de uva com valor agregado, este estudo foi conduzido para determinar o perfil de compostos flavan-3-ol galoilados e não-galoilados nas sementes do bagaço destas mesmas variedades de uva. Foram utilizadas as técnicas de extração líquida pressurizada (PLE), extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada à espectrometria de massas (MS) com captura de íons. Adicionalmente,

utilizou-se a técnica de eletroforese capilar (EC) para investigar a presença de enantiômeros de catequina e epicatequina, considerando-se a possibilidade de epimerização ou racemização dos compostos flavan-3-ol durante o processo de fermentação da vinificação.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Amostras e reagentes

Três amostras de aproximadamente 2 kg cada uma de bagaço da vinificação de uvas tintas foram obtidas através da Estação Experimental da EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina), oriundas da região de Videira, Santa Catarina, safra 2009. Foram utilizadas amostras de bagaço das variedades Sangiovese, Primitivo, Pinot Noir, Negro Amaro e Cabernet Sauvignon da espécie *Vitis vinifera* L.; e da variedade Isabel, espécie *Vitis labrusca* L. As amostras analisadas foram obtidas após o processo de fermentação da vinificação. As sementes foram separadas manualmente e armazenadas a -80 °C até serem analisadas.

Água ultrapura foi preparada com um sistema Direct-Q 3 (Millipore, Billerica, MA). Os solventes para HPLC-ESI-MSⁿ e extração das amostras foram obtidos da J. T. Baker (Griesheim, Alemanha). Ácido gálico (≥99%) foi obtido da Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Alemanha). (2-hidroxipropil)- γ -ciclodextrina e padrões de (+)-catequina, (-)-catequina e (-)-epicatequina foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Padrões de procianidina B1 e procianidina B2 foram obtidos da Extrasynthese (Genay, França). Tetraborato de sódio foi obtido da KMF Laborchemie Handels GmbH (Lohmar, Alemanha) e hidróxido de sódio, dimetilsulfóxido e ácido bórico foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

5.2.2 Extração de polifenóis das amostras secas

Após serem liofilizadas, as sementes de uva foram trituradas em moinho modelo MM2000 (Retsch, Haan, Alemanha) sob congelamento em nitrogênio líquido para a obtenção de um pó fino e homogêneo.

A extração líquida pressurizada (PLE) foi realizada utilizando-se um sistema de extração acelerada com solvente modelo ASE 200 (Dionex, Idstein, Alemanha). Em células de extração fabricadas com aço inoxidável e de 11 mL de capacidade, adicionou-se 1 g de terra diatomácea (Hydromatrix HM-N, Uppsala, Suécia) na base da célula e,

em seguida, 2 g da amostra misturada com 2 g de terra diatomácea. Na base e no topo da célula foram adicionados filtros de celulose (Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Alemanha). Os parâmetros para a PLE foram os seguintes: solvente acetona/água, 70:30 (v/v) (ROCKENBACH et al., 2008), temperatura 25 °C, tempo 10 min, 2 ciclos, 100% de volume de extração. Os extratos foram submetidos à extração em fase sólida (SPE) antes de serem analisados por HPLC e EC.

5.2.3 Extração em fase sólida (SPE)

A SPE foi realizada utilizando-se um sistema Gilson ASPEC XL (Preparação automatizada de amostras com cartuchos de extração, Abimed, Langenfeld, Alemanha) de acordo com um método descrito anteriormente (FRIEDRICH; EBERHARDT; GALENSA, 2000; PAPAGIANNPOULOS et al., 2002). Cartuchos de SPE preenchidos com poliamida (1 g de poliamida, cartuchos de 6 mL, Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) foram condicionados com 10 mL de água destilada por 10 min e lavados com 5 mL de água. Os extratos foram diluídos com água até conterem 20% (v/v) do solvente orgânico antes de serem aplicados aos cartuchos de SPE. Após a aplicação dos extratos, os cartuchos foram lavados com 15 mL de água para a remoção dos interferentes da matriz, e então os compostos fenólicos ligados à poliamida foram eluídos com dimetilsulfóxido/ácido fórmico, 99,9:0,1 (v/v). Durante a eluição, os primeiros 1,5 mL foram descartados por não conterem compostos de interesse, e os 3 mL seguintes foram coletados contendo todos os compostos de interesse. Estes eluatos foram então submetidos à EC e HPLC.

5.2.4 Eletroforese capilar utilizando seletor quiral

Padrões de (+)/(-)-catequina e (-)-epicatequina foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração de 0,1 mg/mL. O eletrólito (0,2 mol/L) foi preparado pela dissolução de quantidades apropriadas de ácido bórico e tetraborato de sódio anidro com pH ajustado para 8,5 com NaOH (KOFINK; PAPAGIANNPOULOS; GALENSA, 2007a). O seletor quiral foi solubilizado na solução tampão de corrida para uma concentração final de 15 µmol/L. Antes de ser utilizada, a solução tampão foi filtrada em filtro de celulose regenerada de tamanho de poro 0,45 µm (IVA, Meerbusch, Alemanha).

As separações quirais foram realizadas em um sistema de eletroforese capilar Beckman P/ACE MDQ (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) equipado com um detector de arranjo de diodos, como descrito por Kofink, Papagiannopoulos e Galensa (2007a). Os eletroferogramas foram armazenados a 210 nm. Os dados foram processados em um computador com o software Beckman 32 Karat versão 7.0. A identificação dos analitos foi realizada comparando-se o tempo de migração e os espectros dos compostos flavan-3-ols. Capilares revestidos de sílica fundida de 375 μm o.d. x 75 μm i.d. foram obtidos da Beckman e cortados em partes de 70 cm (comprimento efetivo de 60 cm). Os capilares foram inicialmente lavados com NaOH (0,25 mol/L) à pressão de 20 p.s.i., durante 20 min, e em seguida com água ultra-pura por 10 min; entre cada corrida foi feita lavagem com NaOH (0,25 mol/L) por 3 min, e em seguida com água ultra-pura por 2 min, e reequilíbrio com o tampão de corrida por 5 min. A temperatura do capilar foi ajustada para 18 °C e a voltagem aplicada foi de 18 kV. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente por 3 s sob pressão de 0,3 p.s.i.

5.2.5 Identificação dos compostos flavan-3-ol galoilados e não-galoilados por HPLC-ESI-MSⁿ

As análises foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida modelo Dionex Summit, consistindo de um desgaseificador modelo Degasys DG-1310 (Uniflows, Tóquio, Japão), uma bomba modelo Ultimate 3000, um injetor de amostra automático modelo ASI-100 T, um forno de coluna modelo STH-585 e um detector de arranjo de diodos modelo Ultimate 3000 equipado com uma célula capilar (Dionex, Germering, Alemanha). O sistema foi controlado usando o software Chromeleon versão 6.80 SR9 Build 2673 (Dionex). A coluna analítica (Aqua 3 μm C18, 150 mm, 2 mm i.d.) foi equipada com uma pré-coluna (Security Guard, C18, 4 mm, 2 mm i.d.; ambas da Phenomenex, Aschaffenburg, Alemanha) e mantida a 35 °C. Os solventes utilizados foram ácido acético a 1% (v/v) em água ultrapura (fase móvel A) e ácido acético a 1% (v/v) em acetonitrila (fase móvel B) em uma taxa de fluxo de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. Um programa de eluição gradiente foi utilizado iniciando com 0% de B e gradiente linear até 8% de B após 60 min, até 15% de B após 70 min, até 40% de B após 130 min, e até 100% de B após 131 min. A coluna foi lavada com 100% de B por 9 min e reequilibrada por 9 min nas condições iniciais. Para as análises, foram injetados 10 μL de cada amostra. Um espectrômetro de massas com

captura de íons LCQ classic equipado com um sistema de ionização por eletrospray (ESI) e um kit de agulha metálica foi acoplado ao sistema de HPLC e controlado com o software Xcalibur versão 2.0 (Thermo Finnigan, Egelsbach, Alemanha). Um fluxo de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ de metanol controlado por um sistema de solvente programável modelo System Gold module 116 (Beckman, Unterschleissheim, Alemanha) foi adicionado através de uma conexão em T ao eluente da HPLC antes que este chegasse à fonte de íons para favorecer a ionização de compostos bastante polares. Os parâmetros para a MS foram os seguintes: voltagem da fonte de ionização de 4,5 kV (em modo negativo), fluxo do gás de bainha/nebulização 60 (unidade arbitrária), fluxo do gás auxiliar ou de dessolvatação 60 (unidade arbitrária), voltagem do capilar -45 V, temperatura do capilar 300 °C, voltagem do primeiro octapolo +3,0 V, voltagem das lentes interoctapolo +22,0 V, voltagem do segundo octapolo +7,0 V, voltagem da corrente contínua (DC) na captura de elétrons +10,2 V.

A identificação dos compostos fenólicos foi realizada com o auxílio de padrões no caso do ácido gálico, catequina, epicatequina e procianidinas B1 e B2. Os demais compostos foram tentativamente identificados pela combinação dos espectros UV e dos dados de fragmentação da MS das amostras após a PLE e a SPE. Adicionalmente, também foi utilizada na identificação dos compostos a comparação com dados da literatura, quando disponíveis.

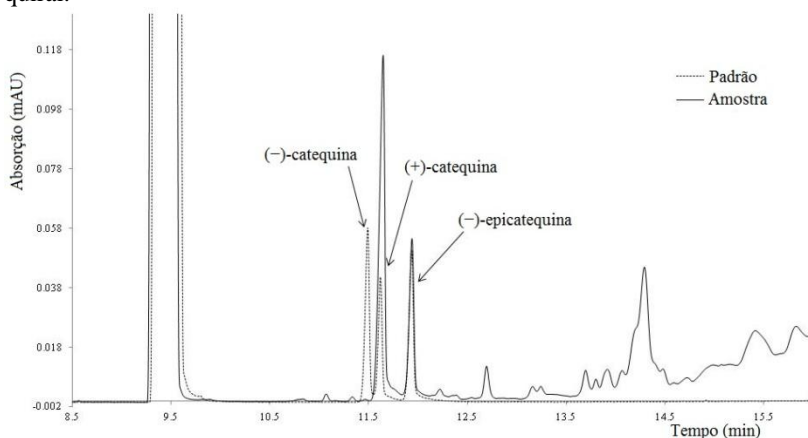
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Eletroforese capilar utilizando seletor quiral

De um ponto de vista analítico, compostos como catequina e epicatequina podem ser detectados e quantificados utilizando-se métodos bastante conhecidos e relativamente simples. No entanto, a maioria dos métodos empregados não é capaz de identificar a presença de enantiômeros destes monômeros. Os enantiômeros de um analito exibem a mesma densidade de carga, assim, suas mobilidades eletroforéticas são as mesmas e eles não podem ser separados. Portanto, torna-se importante a adição de um seletor quiral ao eletrólito que seja capaz de interagir com o analito. O seletor quiral forma associações diastereoméricas temporárias com cada enantiômero (KOFINK; PAPAGIANNOPOULOS; GALENSA, 2007a). A Figura 8 mostra a sobreposição de eletroferogramas da separação quiral dos padrões de (+)/(-)-catequina e (-)-epicatequina e do extrato de semente de uva da

variedade Pinot Noir utilizando a (2-hidroxipropil)- γ -ciclodextrina como seletor quiral. A (+)-catequina e a (-)-epicatequina foram identificadas em todas as amostras de semente de uva. A (-)-catequina e a (+)-epicatequina não foram detectadas. Com base nestes resultados, nós concluímos que estes enantiômeros não foram formados nas condições de fermentação da produção do vinho.

Figura 8 – Sobreposição de eletroferogramas da separação quiral dos padrões de (+)/(-)-catequina e (-)-epicatequina e do extrato de semente de uva da variedade Pinot Noir utilizando a (2-hidroxipropil)- γ -ciclodextrina como seletor quiral.



5.3.2 Identificação dos compostos flavan-3-ol galoilados e não-galoilados por HPLC-ESI-MSⁿ

Embora vários compostos fenólicos, bem como o conteúdo fenólico total das amostras analisadas neste estudo já tenham sido descritos anteriormente (ROCKENBACH et al., 2011a), informações específicas sobre o conteúdo de compostos flavan-3-ol galoilados e não-galoilados destas amostras ainda não foram apresentadas. Para esta finalidade, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas com captura de íons (HPLC-ESI-MSⁿ) representa uma ferramenta poderosa para a análise de fitoquímicos em extratos vegetais. Ela fornece informações estruturais vantajosas e permite a identificação tentativa dos compostos das amostras quando compostos padrões de referência não estão disponíveis e quando os picos apresentam espectros de absorção UV e tempos de retenção muito

parecidos. Além disso, é importante mencionar que atualmente a HPLC em fase reversa permite a separação satisfatória de procianidinas de uvas e vinhos somente até trímeros. Oligômeros de cadeia maior e outros compostos fenólicos eluem simultaneamente quando a coluna é lavada com solventes orgânicos fortes (SUN et al., 2006).

A Tabela 8 mostra os compostos fenólicos identificados nas sementes das diferentes variedades de uva. A maioria dos compostos detectados estava presente em todas as amostras analisadas. No total foram detectados 70 compostos diferentes. A Figura 9 mostra o cromatograma (HPLC-DAD) obtido a partir do extrato da semente de uva da variedade Pinot Noir (processado a 280 nm). O ácido gálico foi identificado em todas as amostras de semente de uva. A identificação do ácido gálico (pico 1) foi confirmada pelo mesmo tempo de retenção e dados de fragmentação da MS na comparação com o padrão, gerando íons $[M - H]^-$ com m/z 169, que se dissociaram para formar íons com m/z 125 através da liberação de CO_2 . O ácido gálico já havia sido previamente identificado em bagaços de uva das variedades Merlot e Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*), e variedades Bordô e Isabel (*Vitis labrusca*) (ROCKENBACH et al., 2011b).

Tabela 8 - Compostos fenólicos nas sementes de diferentes variedades de uva (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*) identificados por HPLC-ESI-MSⁿ.

Pico	TR ^a (min)	Composto	Variedades	$[M - H]^-$ m/z	Fragmentos (m/z)
1	6,16	Ácido Gálico	PN, NA, CS, P, I, S	169	MS ² [169]: 125
2	14,09	Procianidina trímero	PN, NA, CS, P, I	865	MS ² [865]: 695, 575, 577, 407, 543, 739 MS ³ [865 → 695]: 543, 243, 405, 525, 363, 289
3	28,70	Procianidina dímero	PN	577	MS ² [577]: 439, 393, 425, 269, 533, 559 MS ³ [577 → 439]: 421,

4	30,02	Procianidina dímero	PN, CS, I	577	377 MS ² [577]: 439, 425, 393, 269, 533, 559 MS ³ [577 → 439]: 421, 377, 247
5	31,23	Procianidina dímero	PN, NA, CS, P, I, S	577	MS ² [577]: 425, 407, 451, 289 MS ³ [577 → 425]: 407
6	33,18	Epicatequina a-(4β→8)-catequina (Procianidina dímero B1)	PN, NA, CS, P, I, S	577	MS ² [577]: 425, 407, 451, 289, 559 MS ³ [577 → 425]: 407
7	34,12	Catequina	PN, NA, CS, P, I, S	289	MS ² [289]: 245, 205, 203 MS ³ [289 → 245]: 203, 227, 187, 161, 175
8	35,00	Procianidina trímero	PN, NA, CS, P	865	MS ² [865]: 695, 575, 577, 407, 543, 739 MS ³ [865 → 695]: 543, 243, 405, 525, 363, 289
9	37,49	Não identificado	PN, NA, P	879	MS ² [879]: 709, 727, 547, 439 MS ³ [879 → 709]: 557, 541, 571, 539
10	38,67	Procianidina tetramero	PN, NA	1153	MS ² [1153]: 865, 983, 575, 695, 739 MS ³ [1153 → 865]: 425 MS ³ [1153 → 983]: 739, 577, 610, 564, 676, 831
11	40,49	Procianidina trímero monogalato	PN, NA, CS, P	1017	MS ² [1017]: 865, 695, 847, 557, 727, 739 MS ³ [1017 → 865]: 695, 577, 575, 425, 525, 739

12	41,10	Não identificado	CS	655	MS ² [655]: 407, 425, 529, 365, 449 MS ³ [655 → 407]: 285, 281, 283, 297
13	43,25	Procianidina dímero	PN, NA, CS, P, I, S	577	MS ² [577]: 425, 407, 451, 289, 559 MS ³ [577 → 425]: 407
14	44,25	Procianidina trímero	PN, NA, CS, I, S	865	MS ² [865]: 695, 577, 575, 739, 407, 713 MS ³ [865 → 695]: 543, 677, 243, 289
15	45,49	Procianidina trímero	PN, NA, CS	865	MS ² [865]: 695, 577, 407, 449, 543, 587, 739, 713 MS ³ [865 → 695]: 543, 677, 433, 451, 289
16	46,35	Procianidina tetramero	PN	1153	MS ² [1153]: 983, 865, 575, 863, 1001, 1027, 449 MS ³ [1153 → 983]: 449, 675, 447, 363, 289, 567
17	47,58	Procianidina trímero	NA	865	MS ² [865]: 695, 739, 407, 575, 713, 451 MS ³ [865 → 695]: 525, 405, 543, 243, 677
18	47,95	Procianidina trímero	P	865	MS ² [865]: 695, 739, 577, 575, 407 MS ³ [865 → 695]: 525, 677, 501, 543, 407
19	48,41	Procianidina trímero	PN	865	MS ² [865]: 695, 577, 739, 713, 407, 451, 575, 587 MS ³ [865 → 695]: 525, 543, 677, 243, 557, 289
20	50,33	Epicatequin	PN, NA,	577	MS ² [577]: 425, 407,

		a-(4 β →8)- epicatequina S (Procianidin a dímero B2)	CS, P, I,		451, 289 MS ³ [577 → 425]: 407
21	53,17	Procianidina dímero	PN, NA, CS, P	577	MS ² [577]: 425, 407, 451, 289 MS ³ [577 → 425]: 407
22	56,02	Epicatequin a	PN, NA, CS, P, I, S	289	MS ² [289]: 245, 205, 203 MS ³ [289 → 245]: 203, 227, 187, 161
23	57,86	Procianidina trímero monogalato	PN, NA, CS	1017	MS ² [1017]: 729, 847, 677, 891, 695, 577, 575, 865 MS ³ [1017 → 729]: 577, 407, 425
24	59,46	Procianidina trímero monogalato	PN, NA, CS, S	1017	MS ² [1017]: 729, 677, 847, 575, 559, 577, 695, 865, 727, 739 MS ³ [1017 → 729]: 577, 559, 407, 425, 451
25	60,39	Procianidina tetrâmero	PN, NA	1153	MS ² [1153]: 865, 983, 1027, 863, 577, 575 MS ³ [1153 → 865]: 803, 449, 451, 533, 559
26	61,01	Procianidina dímero monogalato	PN, NA, CS, P, I, S	729	MS ² [729]: 577, 407, 559, 425, 451 MS ³ [729 → 577]: 451, 407, 559, 289
27	62,76	Procianidina trímero monogalato	NA, CS, P	1017	MS ² [1017]: 865, 695, 847, 739, 727 MS ³ [1017 → 865]: 695, 407, 577, 727, 425
28	64,23	Procianidina	PN, NA,	729	MS ² [729]: 407, 559,

		dímero monogalato	CS, P, S		577, 451, 603 MS ³ [729 → 407]: 285, 283, 297, 389
29	66,94	Procianidina dímero monogalato	PN, NA, CS	729	MS ² [729]: 577, 559, 407, 425, 451 MS ³ [729 → 577]: 407, 451, 289, 425, 559
30	67,03	Procianidina I trímero		865	MS ² [865]: 695, 407, 713, 577, 543, 451 MS ³ [865 → 695]: 525, 543, 568
31	67,49	Procianidina trímero	PN, NA, CS, P	865	MS ² [865]: 695, 577, 407, 739, 713 MS ³ [865 → 695]: 525, 543, 407, 243, 391
32	68,40	Procianidina trímero	PN, NA, CS, P, I, S	865	MS ² [865]: 695, 577, 407, 575, 713, 739, 543 MS ³ [865 → 695]: 543, 243, 525, 391, 677, 651
33	68,40	Procianidina dímero monogalato	PN, NA, CS, P, I, S	729	MS ² [729]: 407, 559, 577, 451, 441 MS ³ [729 → 407]: 285, 297, 283, 389
34	69,83	Procianidina dímero	PN, NA, CS, P	577	MS ² [577]: 425, 407, 451, 289, 559 MS ³ [577 → 425]: 407
35	70,26	Procianidina trímero monogalato	PN, NA, CS, S	1017	MS ² [1017]: 729, 847, 891, 771 MS ³ [1017 → 729]: 559, 407, 603, 577, 451, 289, 467, 541
36	70,68	Procianidina tetrâmero	PN, CS	1153	MS ² [1153]: 983, 575, 865, 1027, 863, 739 MS ³ [1153 → 983]: 692, 705, 530, 425

				MS ³ [1153 → 575]: 423, 449, 413, 405
37	71,60	Procianidina NA trímero	865	MS ² [865]: 695, 577, 407, 575, 587, 739 MS ³ [865 → 695]: 525, 651, 391, 243, 405
38	72,04	Procianidina CS trímero	865	MS ² [865]: 695, 739, 577, 407, 587 MS ³ [865 → 695]: 407, 525, 543
39	73,00	Procianidina CS trímero monogalato	1017	MS ² [1017]: 695, 847, 677, 865, 729, 739, 891, 407 MS ³ [1017 → 847]: 677, 695, 659, 525
40	73,98	(epi)Catequi PN na-etil dímero	605	MS ² [605]: 315, 289, 453 MS ³ [605 → 315]: 205, 229, 271, 247
41	74,35	(epi)Catequi NA, P, S na monogalato	441	MS ² [441]: 289, 169 MS ³ [441 → 289]: 245, 205, 203
42	74,39	(epi)Catequi I na-etil trímero	893	MS ² [893]: 577, 451, 603, 425, 315 MS ³ [893 → 577]: 407, 451, 425, 541
43	75,06	Procianidina CS tetramero	1153	MS ² [1153]: 575, 983, 865, 863, 449, 1027 MS ³ [1153 → 575]: 423, 287, 449, 405, 285, 289
44	75,11	Procianidina PN, NA, dímero CS, P, S digalato	881	MS ² [881]: 729, 559, 407, 711, 577 MS ³ [881 → 729]: 451, 407, 577, 603, 441, 559, 289

45	76,19	Procianidina NA, CS trímero	865	MS ² [865]: 695, 407, 575, 543 MS ³ [865 → 695]: 543, 243, 525, 289
46	76,80	Procianidina CS trímero	865	MS ² [865]: 695, 575, 407, 739, 713 MS ³ [865 → 695]: 543, 405, 525, 243, 677
47	77,16	Procianidina CS, P trímero	865	MS ² [865]: 695, 575, 407, 713, 543, 577 MS ³ [865 → 695]: 525, 543, 243, 677, 451
48	77,20	Procianidina PN, NA trímero monogalato	1017	MS ² [1017]: 729, 847, 865, 891 MS ³ [1017 → 729]: 407, 559, 451, 603, 577
49	77,91	Procianidina P dímero monogalato	729	MS ² [729]: 577, 407, 559, 425, 289 MS ³ [729 → 577]: 407, 451, 289, 559
50	78,55	(epi)Catequi PN na-etil dímero	605	MS ² [605]: 315, 289, 453 MS ³ [605 → 315]: 229, 271, 205, 191, 253
51	79,27	Procianidina NA trímero digalato	1169	MS ² [1169]: 1017, 729, 847, 999, 891, 577 MS ³ [1169 → 1017]: 729, 847, 321, 621, 495, 603, 451, 289, 577
52	82,21	Procianidina NA,CS trímero monogalato	1017	MS ² [1017]: 847, 729, 407, 891 MS ³ [1017 → 847]: 677, 695, 525, 603, 451, 405
53	82,64	Procianidina NA, CS, trímero P	1017	MS ² [1017]: 729, 847, 695, 771, 891, 865, 407

		monogalato		MS ³ [1017 → 729]: 407, 603, 577, 451, 289
54	83,12	Procianidina NA, CS trímero monogalato	1017	MS ² [1017]: 847, 729, 891, 407, 695 MS ³ [1017 → 729]: 407, 451, 559, 603, 577
55	83,76	Procianidina NA trímero digalato	1169	MS ² [1169]: 881, 729, 999, 1017, 1043 MS ³ [1169 → 881]: 729, 407, 559, 711, 577, 289
56	84,23	(epi)Catequi PN na-etil trímero	893	MS ² [893]: 603, 577, 451, 433, 407, 425, 315 MS ³ [893 → 603]: 451, 433, 289
57	84,99	Procianidina PN, NA, dímero CS, P, S monogalato	729	MS ² [729]: 407, 559, 577, 451, 441, 603, 289 MS ³ [729 → 407]: 285, 256, 281, 297, 283, 243, 389
58	86,72	(epi)Catequi PN, I na-etil dímero	605	MS ² [605]: 315, 289, 453 MS ³ [605 → 315]: 229, 271, 205, 247
59	88,05	(epi)Catequi PN na-etil trímero	893	MS ² [893]: 603, 577, 451, 433, 407, 425 MS ³ [893 → 603]: 451, 433, 289
60	88,15	Procianidina NA, CS, dímero P, S digalato	881	MS ² [881]: 729, 711, 559, 407, 577 MS ³ [881 → 729]: 407, 451, 559, 577, 603, 441, 289
61	88,95	(epi)Catequi PN, NA, na-etil P, I dímero	605	MS ² [605]: 315, 289, 453 MS ³ [605 → 315]: 229,

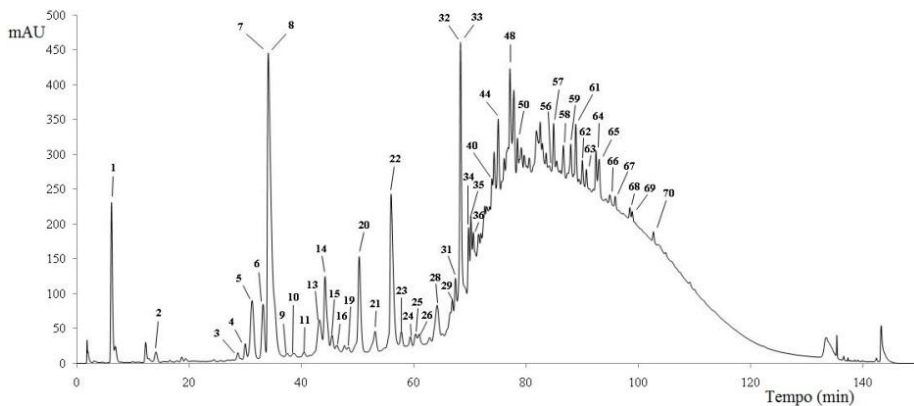
				271, 205, 247
62	90,12	(epi)Catequi PN na-etil dímero	605	MS ² [605]: 315, 289 MS ³ [605 → 315]: 229, 271, 205
63	90,83	(epi)Catequi PN na-etil dímero	605	MS ² [605]: 315, 289, 453 MS ³ [605 → 315]: 205, 229, 271, 247
64	92,54	(epi)Catequi PN, P, I na-etil dímero	605	MS ² [605]: 315, 289, 453 MS ³ [605 → 315]: 229, 271, 205
65	93,09	(epi)Catequi PN, NA, I na-etil dímero	605	MS ² [605]: 315, 289, 453 MS ³ [605 → 315]: 229, 271, 205
66	94,99	(epi)Catequi PN na-etil trímero	893	MS ² [893]: 603, 577, 451, 433, 741, 315 MS ³ [893 → 603]: 451, 287, 433, 266, 289
67	95,97	(epi)Catequi PN na-etil dímero	605	MS ² [605]: 315, 289 MS ³ [605 → 315]: 271, 229, 205, 191, 297, 247
68	98,57	(epi)Catequi PN na-etil dímero	605	MS ² [605]: 315, 289 MS ³ [605 → 315]: 229, 271, 205, 247
69	99,01	(epi)Catequi PN na-etil dímero	605	MS ² [605]: 315, 289 MS ³ [605 → 315]: 271, 229, 205, 247
70	102,78	(epi)Catequi PN na-etil dímero	605	MS ² [605]: 315, 289 MS ³ [605 → 315]: 229, 205, 247, 271

Ácido gálico, catequina, epicatequina e procianidinas B1 e B2 foram identificados com auxílio de padrões; os demais compostos foram tentativamente identificados.

^a TR = tempo de retenção.

PN = Pinot Noir, NA = Negro Amaro, CS = Cabernet Sauvignon, P = Primitivo, I = Isabel, S = Sangiovese.

Figura 9 – Cromatograma (HPLC-DAD) obtido a partir do extrato da semente de uva da variedade Pinot Noir (processado a 280 nm). A identificação dos picos numerados encontra-se na Tabela 8.



A catequina e a epicatequina ($[M - H]^-$ com m/z 289, picos 7 e 22) foram identificadas com auxílio de padrões e apresentaram fragmentos de MS^2 característicos de m/z 245 (liberação de CO_2), 205 e 203 (ruptura do anel A do composto flavan-3-ol) (SANDHU; GU, 2010). Como já confirmado pelas análises por eletroforese capilar, estes compostos correspondem aos enantiômeros de (+)-catequina e (-)-epicatequina.

Íons ($[M - H]^-$) com m/z 441 (pico 41) foram detectados com um tempo de retenção de 74,35 min. O espectro de MS^2 produziu íons com m/z 289 e 169 correspondendo aos íons desprotonados de (epi)catequina e ácido gálico, respectivamente. O maior fragmento em MS^3 foi em m/z 245, indicando a descarboxilação da (epi)catequina, e os fragmentos menores em m/z 205 e 203 sugerindo os padrões característicos de fragmentação da (epi)catequina. Com base nos dados da espectrometria de massas e em dados disponíveis na literatura (SANDHU; GU, 2010), este composto foi tentativamente identificado como (epi)catequina monogalato.

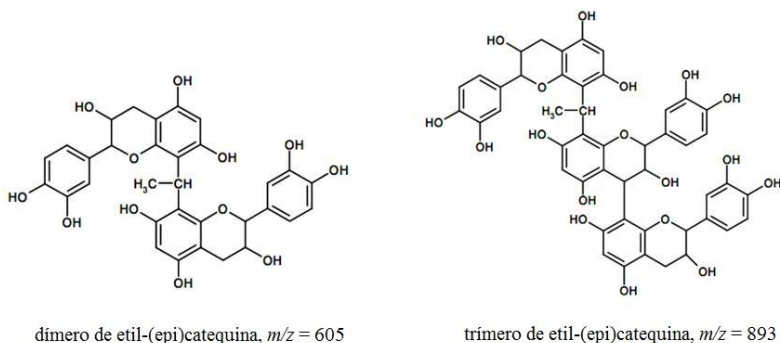
Os íons carregados negativamente ($[M - H]^-$) com m/z 577 (picos 3-6, 13, 20, 21 e 34) correspondem aos diferentes dímeros de

procianidina. Como descrito por Gu et al. (2003), um dímero de procianidina consiste de uma unidade de extensão e uma unidade terminal. O anel heterocíclico das unidades de flavan-3-ols fragmenta-se através de mecanismos conhecidos como RDA (retro-Diels-Alder) e HRF (heterocyclic ring fission). Ambos os mecanismos de fragmentação podem ocorrer tanto na unidade de extensão quanto na unidade terminal. No entanto, a fragmentação na unidade de extensão dá origem a íons com um sistema π - π hiperconjugado maior, assim, esta fragmentação é mais favorável energeticamente. Em nosso estudo, as procianidinas B1 e B2 foram identificadas com auxílio de padrões. A fragmentação RDA dos dímeros produziu majoritariamente íons com m/z 425 ($[M - H - 152]^-$). Íons com m/z 407 ($[M - H - 152 - 18]^-$) resultam da eliminação de uma molécula de água a partir dos íons com m/z 425, principalmente do OH na posição 3 do anel C (GU et al., 2003). Os íons com m/z 451 ($[M - H - 126]^-$) resultam da eliminação da molécula de floroglucinol (anel A) (HAYASAKA et al., 2003). Íons com m/z 559 ($[M - H - 18]^-$) resultam da eliminação de uma molécula de água a partir da procianidina (m/z 577), e os íons com m/z 289 ($[M - H - 288]^-$) resultam da eliminação de uma molécula de (epi)catequina (SANDHU; GU, 2010). No total, foram identificados 8 diferentes isômeros para os dímeros de procianidina, os quais podem ser atribuídos aos dímeros B1-B8, como descrito previamente por De Freitas et al. (1998).

Íons ($[M - H]^-$) com m/z 605 (picos 40, 50, 58, 61-65 e 67-70) foram tentativamente identificados como dímeros de etil-(epi)catequina (Figura 10), correspondendo a produtos condensados de (epi)catequina com acetaldeído, com duas unidades de (epi)catequina ligadas por uma ponte etil (SAUCIER et al., 1997). Como descrito por He et al. (2008), o acetaldeído é o aldeído mais abundante presente nos vinhos e é formado de diferentes formas, como um produto intermediário da fermentação, ou a partir da oxidação do etanol, ou a partir da adição de aguardente de vinho ao mosto a fim de interromper a fermentação. Em meio ácido, como no vinho, após a protonação do acetaldeído, os flavanóis podem sofrer substituição eletrofílica pelo acetaldeído nas posições nucleofílicas C6 ou C8 do anel A, dando origem à formação de produtos condensados. A presença destes produtos condensados nas amostras analisadas neste estudo pode ser esperada, uma vez que as sementes foram separadas do bagaço coletado após a fermentação. A ocorrência de mais de um composto com o mesmo valor m/z indica a presença de diferentes isômeros. Como íon secundário, o sinal com m/z 315 corresponde a um aduto de vinil-catequina. Saucier et al. (1997) também encontraram uma alta abundância relativa de resíduos de vinil-catequina

(m/z 315) em seus dados de espectrometria de massas e os atribuíram à instabilidade dos oligômeros de catequina que possuem pontes etil. Além disso, outro fragmento com m/z 453 também foi detectado, decorrente presumivelmente da fragmentação RDA dos dímeros de etil-(epi)catequina (SAUCIER et al., 1997).

Figura 10 – Estrutura química básica de possíveis dímeros e trímeros de etil-(epi)catequina.



Os íons ($[M - H]^-$) com m/z 655 (pico 12) detectados na semente de uva da variedade Cabernet Sauvignon com um tempo de retenção de 41,10 min não puderam ser identificados. No entanto, os dados de fragmentação MS^n (m/z 407 e 425) indicam presumivelmente que se trata de um íon pseudo-molecular de uma procianidina oligomérica.

Os íons carregados negativamente ($[M - H]^-$) com m/z 729 (picos 26, 28, 29, 33, 49 e 57) deram origem a fragmentos em MS^2 com m/z 577 ($[M - H - 152]^-$) correspondendo à liberação de um grupo galoil, m/z 441 ($[M - H - 288]^-$) correspondendo à liberação de uma molécula de (epi)catequina, e m/z 603 ($[M - H - 126]^-$) correspondendo à eliminação de uma molécula de floroglucinol (anel A). A formação de íons com m/z 407, 559, 425 e 451 sugere a fragmentação característica dos dímeros de procianidina descrita anteriormente. A formação dos íons com m/z 289 corresponde à liberação de um grupo galoil seguida pela liberação de uma molécula de (epi)catequina ($[M - H - 152 - 288]^-$), ou à liberação de uma fração (epi)catequina galato ($[M - H - 441]^-$). Com base nos dados de espectrometria de massas, estes compostos foram tentativamente identificados como dímeros de procianidina monogalato (SANDHU; GU, 2010).

Compostos que geraram íons ($[M - H]^-$) com m/z 865 (picos 2, 8, 14, 15, 17-19, 30-32, 37, 38 e 45-47) foram identificados como trímeros de procianidina, compostos tipicamente presentes em sementes de uva (TSANG et al., 2005). Tsang et al. (2005) também reportaram fragmentos de MS^2 com m/z 713, 695, 577 e 407. De acordo com estes autores, os fragmentos com m/z 713 (liberação de 152 Da) têm origem a partir de uma fissão RDA do anel heterocíclico. Os íons com m/z 695 (liberação de 170 Da) correspondem a uma fissão RDA seguida pela liberação de uma molécula de água. Os íons com m/z 577 (liberação de 288 Da) correspondem à ruptura da ligação interflavânica. Já os íons com m/z 451 e 407 sugerem a fragmentação característica dos dímeros de procianidina descrita anteriormente.

O composto identificado no tempo de retenção de 37,49 min e com íons ($[M - H]^-$) apresentando m/z 879 (pico 9), detectado nas sementes de uva das variedades Pinot Noir, Negro Amaro e Primitivo gerou íons em MS^2 com m/z 709, 727, 547 e 439. Os dados de fragmentação MS^n obtidos não permitiram a identificação deste composto.

Os íons ($[M - H]^-$) com m/z 881 (picos 44 e 60) sugerem duas possíveis estruturas, ou um éster digalato de um dímero de procianidina ou um trímero no qual uma das unidades de flavanol é a (epi)galocatequina. As massas destes compostos diferem em apenas 0,04 Da, no entanto, as estruturas foram facilmente distinguidas pela dissociação induzida por colisão. Os íons resultantes em maior abundância, com m/z 729, foram formados pela eliminação de um fragmento neutro de 152 Da a partir dos íons iniciais (m/z 881) através da eliminação ou de um grupo galoil ou do anel B do flavanol juntamente com porções do anel C originadas de uma fissão RDA. Além disso, a dissociação induzida por colisão causou sucessivas expulsões adicionais de um ou dois fragmentos de 152 Da, dando origem a íons com m/z 577 e 407 ($425 - H_2O$). A dissociação induzida por colisão dos íons com m/z 729 em MS^3 gerou ainda eliminações de fragmentos com 152 Da dando origem a íons com m/z 577 e 559 ($577 - H_2O$). Rupturas de ligações interflavânicas ocorreram provocando a formação de íons com m/z 289 e 441 Da, correspondendo, respectivamente, a uma (epi)catequina e ao éster galato de um destes flavanóis. A fragmentação esperada a partir da estrutura de um dímero digalato gera múltiplas eliminações de fragmentos de 152 Da, oriundos tanto da eliminação de grupos galoil quanto de fissões RDA, como mencionado acima. Por outro lado, a estrutura alternativa de um trímero mencionada acima não proporciona, caracteristicamente, a eliminação de mais de um fragmento

de 152 Da. Adicionalmente, rupturas interflavânicas na estrutura do trímero não produziram fragmentos com m/z 441, os quais podem ser observados em MS^3 (AGARWAL et al., 2007). Estes dados, portanto, são consistentes apenas com a estrutura de um dímero de procianidina digalato.

Os picos (42, 56, 59 e 66) correspondentes aos íons ($[M - H]^-$) com m/z 893 foram tentativamente identificados como trímeros de etil-(epi)catequina (Figura 10), produtos condensados de (epi)catequina com acetaldeído, sendo formados por três unidades de (epi)catequina com uma ponte etil. Como fragmentos, foram observados adutos de vinilcatequina com m/z 315 (como observado na fragmentação dos dímeros de etil-(epi)catequina, m/z 605), íons resultantes de fissões RDA a partir de trímeros, e íons característicos da fragmentação de dímeros de procianidina. Ao nosso conhecimento, esta é a primeira vez que trímeros de etil-(epi)catequina são relatados em subprodutos da vinificação. Portanto, a presença de trímeros de etil-(epi)catequina em sementes obtidas do bagaço da vinificação constitui um novo elemento a ser considerado na avaliação estrutural dos compostos presentes nestes subprodutos.

Íons ($[M - H]^-$) com m/z 1017 (picos 11, 23, 24, 27, 35, 39, 48 e 52-54) foram presumivelmente identificados como trímeros de procianidina monogalato. De acordo com Valls et al. (2009), a fragmentação característica destes compostos produz íons com m/z 891, 847, 729, 695, 603, 559, 451 e 289.

Os íons carregados negativamente ($[M - H]^-$) com m/z 1153 (picos 10, 16, 25, 36 e 43) foram tentativamente identificados como íons pseudo-moleculares de tetrâmeros de procianidina. A fragmentação em MS^2 destes íons deu origem a íons com m/z 865, 983, 575, 863 e 1027. Os íons com m/z 1027 ($[M - H - 126]^-$) correspondem à liberação da molécula de floroglucinol ($C_6H_6O_3$, anel A). Os íons com m/z 865 ($[M - H - 288]^-$) e m/z 575 ($[M - H - 578]^-$) correspondem, respectivamente, à liberação de uma unidade na parte superior da molécula do flavanol e à liberação de duas unidades na parte inferior (SUN et al., 2006).

Finalmente, os picos 51 e 55 correspondem aos íons ($[M - H]^-$) com m/z 1169, os quais geraram fragmentos em MS^2 com m/z 1017, 729, 847, 891, 577, 881, 999 e 1043. Com base nos dados de fragmentação MS^n e comparação com dados da literatura (DE FREITAS et al., 1998; PASSOS et al., 2007), estes compostos foram presumivelmente identificados como trímeros de procianidina digalato.

5.4 CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam que as sementes obtidas a partir do bagaço da vinificação de uvas tintas contêm uma grande variedade de compostos flavan-3-ol, incluindo tanto compostos galoilados quanto não-galoilados. Puderam ser detectados oligômeros com até quatro unidades monoméricas. Nós relatamos pela primeira vez a presença de trímeros de etil-(epi)catequina em subprodutos da vinificação, sendo também detectados dímeros correspondentes. Nós também demonstramos que o processo de fermentação da vinificação não deu origem aos enantiômeros de (-)-catequina e (+)-epicatequina. Somente a (+)-catequina e a (-)-epicatequina puderam ser detectadas, o que nos permite presumir que os compostos flavan-3-ol condensados presentes nas sementes de uva são formados exclusivamente por estes enantiômeros. Os dados obtidos deverão servir de suporte para a exploração das sementes de uva como uma fonte potencial de antioxidantes naturais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As frações de bagaço, cascas e sementes de subprodutos obtidos a partir da vinificação de uvas tintas foram caracterizadas quanto à sua composição fenólica e seu potencial antioxidante. Diferentes métodos e princípios foram utilizados para a determinação da atividade antioxidante das amostras. Avaliou-se a possível presença de enantiômeros de catequina e epicatequina nas sementes de uva analisadas utilizando-se eletroforese capilar e seletor quiral. A identificação de compostos flavan-3-ol nas sementes de uva foi realizada com auxílio da espectrometria de massas.

Os subprodutos obtidos da vinificação contêm alto teor de compostos fenólicos, principalmente procianidinas das sementes, os quais apresentam elevado potencial antioxidante frente a espécies reativas nos métodos utilizados para análise. Extratos obtidos a partir destes subprodutos deverão ser utilizados em novos estudos visando sua utilização em alimentos. A caracterização de compostos fenólicos e de seu potencial antioxidante em subprodutos da vinificação deverá ser estendida a outras variedades de uva utilizadas na produção do vinho. Estudos utilizando os extratos de subprodutos da vinificação também são indicados para avaliar o efeito dos compostos fenólicos em sistemas biológicos.

É importante ressaltar ainda que a parceria com outros laboratórios e grupos de pesquisa, inclusive de outros países, para o desenvolvimento de estudos científicos é uma ferramenta valiosa para o aprofundamento das técnicas utilizadas, para a troca de experiências e para a convergência de interesses comuns no campo científico e tecnológico.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, C.; VELURI, R.; KAUR, M.; CHOU, S.-C.; THOMPSON, J. A.; AGARWAL, R. Fractionation of high molecular weight tannins in grape seed extract and identification of procyanidin B2-3,3'-di-O-gallate as a major active constituent causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 7, p. 1478-1484, 2007.
- 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.
- ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1124-1131, 2004.
- AZIZ, M. H.; KUMAR, R.; AHMAD, N. Cancer chemoprevention by resveratrol: in vitro and in vivo studies and the underlying mechanisms (Review). **International Journal of Oncology**, v. 23, p. 17-28, 2003.
- BAIS, H. P.; WALKER, T. S.; STERMITZ, F. R.; HUFBAUER, R. A.; VIVANCO, J. M. Enantiomeric-dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (±)-catechin. A rhizosecreted racemic mixture from spotted knapweed. **Plant Physiology**, v. 128, p. 1173-1179, 2002.
- BALIGA, M. S.; KATIYAR, S. K. Chemoprevention of photocarcinogenesis by selected dietary botanicals. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 5, p. 243-253, 2006.
- BARTOLOMÉ, B.; NUÑEZ, V.; MONAGAS, M.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. In vitro antioxidant activity of red grape skins. **European Food Research and Technology**, v. 218, p. 173-177, 2004.

- 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.
- 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.
- BOUSSETTA, N.; VOROBIEV, E.; DELOISON, V.; POCHEZ, F.; FALCIMAIGNE-CORDIN, A.; LANOISELLÉ, J.-L. Valorisation of grape pomace by the extraction of phenolic antioxidants: Application of high voltage electrical discharges. **Food Chemistry**, v. 128, p. 364–370, 2011.
- BOZAN, B.; TOSUN, G.; ÖZCAN, D. Study of polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antiradical activity. **Food Chemistry**, v. 109, p. 426–430, 2008.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- BRANNAN, R. G. Effect of grape seed extract on physicochemical properties of ground, salted, chicken thigh meat during refrigerated storage at different relative humidity levels. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 1, p. C36–C40, 2008.
- CAMPOS, L. **Obtenção de extratos de bagaço de uva Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*): Parâmetros de processo e modelagem matemática**. Florianópolis, 2005. Tese de mestrado em Engenharia de Alimentos - Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, 2005.
- CAMPOS, L. M. A. S.; LEIMANN, F. V.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8413–8420, 2008.

- CARERI, M.; CORRADINI, C.; ELVIRI, L.; NICOLETTI, I.; ZAGNONI, I. Direct HPLC analysis of quercetin and *trans*-resveratrol in red wine, grape, and winemaking byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5226–5231, 2003.
- CATANEO, C. B.; CALIARI, V.; GONZAGA, L. V.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Capacidade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Semina**, v. 29, p. 17-22, 2008.
- CHANKVETADZE, B. Enantioseparations by using capillary electrophoretic techniques. The story of 20 and a few more years. **Journal of Chromatography A**, v. 1168, p. 45-70, 2007.
- CIRICO, T. L.; OMAYE, S. T. Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low-density lipoprotein oxidation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 4, p. 510–516, 2006.
- DEEPA, N.; KAUR, C.; GEORGE, B.; SINGH, B.; KAPOOR, H. C. Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes during maturity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 121–129, 2007.
- DE FREITAS, V. A. P.; GLORIES, Y.; BOURGEOIS, G.; VITRY, C. Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry. **Phytochemistry**, v. 49, n. 5, p. 1435-1441, 1998.
- DOSHI, P.; ADSULE, P.; BANERJEE, K. Phenolic composition and antioxidant activity in grapevine parts and berries (*Vitis vinifera* L.) cv. Kishmish Chorny (Sharad Seedless) during maturation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 1–9, 2006.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.
- EINBOND, L. S.; REYNERTSON, K. A.; LUO, X.-D.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v. 84, p. 23–28. 2004.

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.

FRIEDRICH, W.; EBERHARDT, A.; GALENSA, R. Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. **European Food Research and Technology**, v. 211, p. 56-64, 2000.

GARCÍA-CONESA, M. T.; WILSON, P. D.; PLUMB, G. W.; RALPH, J.; WILLIAMSON, G. Antioxidant properties of 4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy-beta, beta'-bicinnamic acid (8-8-diferulic acid, non-cyclic form). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 379-384, 1999.

GENOVESE, M. I.; PINTO, M. S.; GONÇALVES, A. E. S. S.; LAJOLO, F. M. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. **Food Science and Technology International**, v. 14, p. 207-214, 2008.

GHAFOOR, K.; CHOI, Y. H.; JEON, J. Y.; JO, I. H. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants, and Anthocyanins from Grape (*Vitis vinifera*) Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 4988-4994, 2009.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-Visible spectroscopy. In R. E. Wrolstad (Ed.), **Current protocols in food analytical chemistry**. New York: John Wiley and Sons. Unit. F1.2.1-13, 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.

GONTHIER, M.; VERNY, M.; BESSON, C.; REMESY, C.; SCALBERT, A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. **Journal Nutrition**, v. 133, p. 1853-1859, 2003.

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

GU, L.; KELM, M. A.; HAMMERSTONE, J. F.; BEECHER, G.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D.; PRIOR, R. L. Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7513-7521, 2003.

HAGERMAN, A. E.; RIEDL, K. M.; JONES, G. A.; SOVIK, K. N.; RITCHARD, N. T.; HARTZFELD, P. W.; RIECHEL, T. L. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1887-1892, 1998.

HAYASAKA, Y.; WATERS, E. J.; CHEYNIER, V.; HERDERICH, M. J.; VIDAL, S. Characterization of proanthocyanidins in grape seeds using electrospray mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 17, p. 9-16, 2003.

HE, F.; PAN, Q.-H.; SHI, Y.; DUAN, C.-Q. Chemical synthesis of proanthocyanidins in vitro and their reactions in aging wines. **Review. Molecules**, v. 13, p. 3007-3032, 2008.

HEO, H. J.; KIM, Y. J.; CHUNG, D.; KIM, D-O. Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. **Food Chemistry**, v. 104, n. 1, p. 87–92, 2007.

HOGAN, S.; ZHANG, L.; LI, J.; ZOECKLEIN, B.; ZHOU, K. Antioxidant properties and bioactive components of Norton (*Vitis aestivalis*) and Cabernet Franc (*Vitis vinifera*) wine grapes. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 1269–1274, 2009.

IBRAVIN. INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO. **Principais regiões produtoras**. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/regioesprodutoras.php>>. Acesso em: 10 de abril de 2012.

JACOBO-VELÁZQUEZ, D. A.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.
Correlations of antioxidant activity against phenolic content revisited: A new approach in data analysis for food and medicinal plants. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 9, p. R107-R113, 2009.

JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G. O.; SLOWING, K. V.; THOMAS, C. F.; BEECHER, C. W.; FONG, H. H.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; MEHTA, R. G.; MOON, C. R.; PEZZUTO, J. M.
Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v. 275, p. 218-220, 1997.

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.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SELVI, T.; SAKARIAH, K. K.
Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. **Food Research International**, v. 36, p. 117-122, 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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.4360–4367, 2004.

KATALINIĆ, V.; MOŽINA, S. S.; SKROZA, D.; GENERALIĆ, I.; ABRAMOVIĆ, H.; MILOŠ, M.; LJUBENKOV, I.; PISKERNIK, S.; PEZO, I.; TERPINC, P.; BOBAN, M. Phenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). **Food Chemistry**, v. 119, p. 715-723, 2010.

KHANAL, R. C.; HOWARD, L. R.; PRIOR, R. L. Procyanidin content of grape seed and pomace, and total anthocyanin content of grape pomace as affected by extrusion processing. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 6, p. H174-H182, 2009.

KODAMA, S.; YAMAMOTO, A.; MATSUNAGA, A.; YANAI, H.
Direct enantioseparation of catechin and epicatechin in tea drinks by 6-O- α -D-glucosyl- β -cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. **Electrophoresis**, v. 25, p. 2892-2898, 2004.

- KOFINK, M.; PAPAGIANNPOULOS, M.; GALENSA, R. Enantioseparation of catechin and epicatechin in plant food by chiral capillary electrophoresis. **European Food Research Technology**, v. 225, p. 569-577, 2007a.
- KOFINK, M.; PAPAGIANNPOULOS, M.; GALENSA, R. (-)-Catechin in cocoa and chocolate: occurrence and analysis of an atypical flavan-3-ol enantiomer. **Molecules**, v. 12, p. 1274-1288, 2007b.
- KOUNDOURAS, S.; HATZIDIMITRIOU, E.; KARAMOLEGKOU, M.; DIMOPOULOU, E.; KALLITHRAKA, S.; TSIALTAS, J. T.; ZIOZIOU, E.; NIKOLAOU, N.; KOTSERIDIS, Y. Irrigation and rootstock effects on the phenolic concentration and aroma potential of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 7805–7813, 2009.
- LANDRAULT, N.; POUCHERET, P.; RAVEL, P.; GASC, F.; CROS, G.; TEISSEDRE, P.-L. Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3341–3348, 2001.
- LEE, J.; RENNAKER, C.; WROLSTAD, R. E. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. **Food Chemistry**, v. 110, p. 782–786, 2008.
- LOULI, V.; RAGOSSIS, N.; MAGOULAS, K. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 2, p. 201-208, 2004.
- LU, Y.; FOO, L. Y. The polyphenol constituents of grape pomace. **Food Chemistry**, v. 65, p. 1-8, 1999.
- LUTHER, M.; PARRY, J.; MOORE, J.; MENG, J.; ZHANG, Y.; CHENG, Z.; YU, L. Inhibitory effect of Chardonnay and black raspberry seed extracts on lipid oxidation in fish oil and their radical scavenging and antimicrobial properties. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1065-1073, 2007.
- MACHEIX, J-J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. **Fruit phenolics**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990.

- 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. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 125-132, 2007.
- MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Current Opinion in Lipidology**, v. 16, n. 1, p. 77-84, 2005.
- MANTENA, S. K.; BALIGA, M. S.; KATIYAR, S. K. Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 8, p. 1682-1691, 2006.
- MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 45, p. 594-598, 1968.
- MELLO, L. M. R. **Viticultura brasileira: Panorama 2010**. Artigos Técnicos 2011. Embrapa Uva e Vinho. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/prodvit2010.pdf>>. Acesso em: 10 de abril de 2012.
- MONTEALEGRE, R. R.; PECES, R. R.; VOZMEDIANO, J. L. C.; GASCUEÑA, J. M.; ROMERO, E. G. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 687-693, 2006.
- 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.
- MURTHY, K. N. C.; SINGH, R. P.; JAYAPRAKASHA, G. K. Antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5909-5914, 2002.
- NAWAZ, H.; SHI, J.; MITTAL, G. S.; KAKUDA, Y. Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. **Separation and Purification Technology**, v. 48, p. 176-181, 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.

NIXDORF, S. L.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: Phenolic composition and antioxidant capacity. **Analytica Chimica Acta**, v. 659, p. 208–215, 2010.

NYFELER, F.; MOSER, U. K.; WALTER, P. Stereospecific effects of (+)- and (–)-catechin on glycogen metabolism in isolated rat hepatocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 763, p. 50-57, 1983.

ORTIGARA, A. R. C. **Caracterização do efluente de uma vinícola da Região do Vale do Rio do Peixe/SC e avaliação do seu tratamento por biofiltro aerado submerso**. 2009. 140 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

OSZMIANSKI, J.; LEE, C. Y. Isolation and HPLC determination of phenolic compounds in red grapes. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 39, p. 259–262, 1990.

PAPAGIANNOPOULOS, M.; ZIMMERMANN, B.; MELLENTHIN, A.; KRAPPE, M.; MAIO, G.; GALENSA, R. Online coupling of pressurized liquid extraction, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for automated analysis of proanthocyanidins in malt. **Journal of Chromatography A**, v. 958, p. 9-16, 2002.

PASSOS, C. P.; CARDOSO, S. M.; DOMINGUES, M. R. M.; DOMINGUES, P.; SILVA, C. M.; COIMBRA, M. A. Evidence for galloylated type-A procyanidins in grape seeds. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1457-1467, 2007.

PASTRANA-BONILLA, E.; AKOH, C. C.; SELLAPPAN, S.; KREWER, G. Phenolic content and antioxidant capacity of Muscadine grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5497-5503, 2003.

PEDRESCHI, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from Andean purple corn (*Zea mays* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4557–4567, 2006.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; RUBIO, M. E. D.; SERRANO, J.; GOÑI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, v. 41, n. 3, p. 274–285, 2008.

PEYRAT-MAILLARD, M. N.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: Synergistic and antagonistic effects. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, n. 10, p. 1007–1012, 2003.

PRICE, M. L.; SCOYOC, S. V.; BUTLER, L. G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, p. 1214–1218, 1978.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290–4302, 2005.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenolics 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.

RADOVANOVIĆ, B. C.; RADOVANOVIĆ, A. N.; SOUQUET, J.-M. Phenolic profile and free radical-scavenging activity of Cabernet Sauvignon wines of different geographical origins from the Balkan region. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 2455–2461, 2010.

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 and Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

REVILLA, E.; RYAN, J. M. Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography photodiode array detection without sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 461-469, 2000.

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

RITTER, C.; ZIMMERMANN, B. F.; GALENSA, R. Chiral separation of (+)/(-)-catechin from sulfated and glucuronidated metabolites in human plasma after cocoa consumption. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 723-730, 2010.

ROCKENBACH, I. I.; DA 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*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 238-244, 2008.

ROCKENBACH, I. I.; GONZAGA, L. V.; RIZELIO, V. M.; GONÇALVES, A. E. de S. S.; GENOVESE, M. I.; FETT, R. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. **Food Research International**, v. 44, p. 897-901, 2011a.

ROCKENBACH, I. I.; RODRIGUES, E.; GONZAGA, L. V.; CALIARI, V.; GENOVESE, M. I.; GONÇALVES, A. E. de S. S.; FETT, R. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. **Food Chemistry**, v. 127, p. 174-179, 2011b.

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*). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 158-163, 2007.

RODRIGUES, A. C.; OLIVEIRA, J. M.; OLIVEIRA, J. A.; PEIXOTO, J.; NOGUEIRA, R.; BRITO, A. G. Tratamento de efluentes vitivinícolas: um caso de estudo na região dos vinhos verdes. **Indústria e Ambiente**, n. 40, p. 20-25, 2006.

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

SAINT-CRICQ DE GAULEJAC, N.; PROVOST, C.; VIVAS, N. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 425-431, 1999.

SAITO, M.; HOSOYAMA, H.; ARIGA, T.; KATAOKA, S.; YAMAJI, N. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1460–1464, 1998.

SÁNCHEZ-ALONSO, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F.; BORDERÍAS, A. J. Antioxidant protection of white grape pomace on restructured fish products during frozen storage. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 42-50, 2008.

SANDHU, A. K.; GU, L. Antioxidant capacity, phenolic content, and profiling of phenolic compounds in the seeds, skin, and pulp of *Vitis rotundifolia* (Muscadine grapes) as determined by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4681-4692, 2010.

SAUCIER, C.; GUERRA, C.; PLANET, I.; LAGUERRE, M.; GLORIES, Y. (+)-Catechin-acetaldehyde condensation products in relation to wine-ageing. **Phytochemistry**, v. 46, n. 2, p. 229-234, 1997.

SCALZO, J.; POLITI, A.; PELLEGRINI, N.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. **Nutrition**, v. 21, n. 2, p. 207–213, 2005.

SHRIKHANDE, A. J. Wine by-products with health benefits. **Food Research International**, v. 33, p. 469–474, 2000.

SILVA, L. M. L. R. **Caracterização dos Subprodutos da Vinificação**. Revista do ISPV – nº 28. Outubro de 2003. Disponível em: <<http://www.ipv.pt/millenium/Millenium28/10.pdf>> Acesso em: 06 junho 2010.

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

SOARES, M. C.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L. V.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 1-6, 2008.

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

SOMERS, T. C.; ZIEMELIS, G. Spectral evaluation of total phenolic components in *Vitis vinifera*: Grapes and wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 36, p. 1275–1284, 1985.

SUN, B.; LEANDRO, M. C.; DE FREITAS, V.; SPRANGER, M. I. Fractionation of red wine polyphenols by solid-phase extraction and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1128, p. 27-38, 2006.

SUN, B.; SPRANGER, M. I. Review: Quantitative extraction and analysis of grape and wine proanthocyanidins and stilbenes. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v. 20, n. 2, p. 59-89, 2005.

TSANG, C.; AUGER, C.; MULLEN, W.; BORNET, A.; ROUANET, J.-M.; CROZIER, A.; TEISSEGRE, P.-L. The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats. **British Journal of Nutrition**, v. 94, p. 170-181, 2005.

UVIBRA – **União Brasileira de Vinicultura**. Disponível em: <<http://www.uvibra.com.br/>>. Acesso em: Setembro, 2011.

- VALLS, J.; MILLÁN, S.; MARTÍ, M. P.; BORRÀS, E.; AROLA, L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7143-7172, 2009.
- VAN ACKER, S. A. B. E.; DE GROOT, M. J.; VAN DE BERG, D.-J.; TROMP, M. N. J. L.; DEN KELDER, G. D.-O.; VAN DER VIJGH, W. J. F.; BAST, A. A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoid. **Chemical Research in Toxicology**, v. 9, n. 8, p. 1305–1312, 1996.
- YAMAGUCHI, F.; YOSHIMURA, Y.; NAKAZAWA, H.; ARIGA, T. Free radical scavenging activity of grape seed extract and antioxidants by electron spin resonance spectrometry in an H₂O₂/NaOH/DMSO system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 2544-2548, 1999.
- YEMIS, O.; BAKKALBASI, E.; ARTIK, N. Antioxidative activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts obtained from different varieties grown in Turkey. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 154–159, 2008.
- YILDIRIM, H. K.; AKÇAY, Y. D.; GÜVENÇ, U.; ALTINDISLI, A.; SÖZMEN, E. Y. Antioxidant activities of organic grape, pomace, juice, must, wine and their correlation with phenolic content. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 40, p. 133–142, 2005.
- YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 255-260, 2004.
- ZIMMERMANN, B. F. Proanthocyanidins in barley and malt analyzed by pressurized liquid extraction, solid-phase extraction and HPLC. 2005. 75 f. Dissertation (Doktorgrades der Mathematik-Naturwissenschaft) - Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bonn, Bonn, Deutschland.