

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais**

**Priscilla Siqueira Melo**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba  
2010**

**Priscilla Siqueira Melo**  
**Bacharel em Ciências dos Alimentos**

**Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais**

Orientador:  
Prof. Dr. **SEVERINO MATIAS DE ALENCAR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba**  
**2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Melo, Priscilla Siqueira  
Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais / Priscilla Siqueira  
Melo. - - Piracicaba, 2010.  
100 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.  
Bibliografia.

1. Antioxidantes - Atividade 2. Bagaços 3. Composição química 4. Compostos fenólicos  
Resíduos agrícolas I. Título

CDD 664.096  
M528c

**"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"**

Às mulheres da minha vida: Aparecida, Matilde e  
Leonilda. Meus sinônimos para força e amor.  
**DEDICO.**



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela sensatez nos momentos de dúvida e por cuidar das pessoas que amo.

Aos meus pais, Edison e Aparecida, com quem aprendi o valor das coisas simples e por todo o esforço despendido em minha formação. Aos meus avós, Matilde, a pessoa mais linda que conheço, e João. Às minhas amigas-irmãs Patrícia e Renata pela vida compartilhada. Aos meus tios, Leonilda e Roberto pelos incentivos e força espiritual e ao meu querido primo Zé.

Ao professor Severino Matias de Alencar pela orientação deste trabalho e pela liberdade e autonomia que me proporcionou durante o mestrado. Exemplo de dedicação, caráter ético, profissionalismo e bom-humor.

Aos pesquisadores Mauro Celso Zanús, Celito Crivellaro Guerra (Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS) e Giuliano Elias Pereira (Embrapa Semiárido, Petrolina, PE) pela parceria e fornecimento dos resíduos vinícolas. À Damaris da Agroindustrial Ibitirama pelo fornecimento dos bagaços de tomate e goiaba e ao Fernando da AmBev pelo fornecimento do bagaço de malte.

Às professoras Marisa A. B. Regitano d'Arce e Thaís M. F. de Souza Vieira pelo auxílio com as análises no Rancimat e à Solange Guidolin Canniatti Brazaca, Sandra Helena da Cruz, Solange Carpes, Luciana Ferracini dos Santos e Masaharu Ikegaki pelas sugestões a este trabalho.

Ao professor Pedro Rosalen e à Myrella (FOP-UNICAMP) pela contribuição com as análises microbiológicas.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental da ESALQ-USP: Ana Paula (Fubá), Keityane, Adna, Juliana (Dedo), Tatiane, Ivani, Iara (Tófs), Izabela (Bixin), Luciana, Lucimara, Rosângela, Luciana Ferracini e Maria Augusta.

Aos meus amigos do mundo: Miriam (Trakinas), Aline (Inmetro), Talita (Sábado), Rodrigo (Dã-top), Ricardo (Locuthor), Jaqueline (Gergelim), Paola (Phóton), Renata, Amanda, Samuel (Tunico), Clayton, Kleber, Ana Paula, Paulo (Spiño), Selma (Rapel), Luciane, Clémentine, Roque, Luzimário, Ana Lúcia (Kurau), Cristiane, Adriano, Rogério, Nê, Vânia, Anderson (Paiedi) e Lucas (Makunaíma).

Ao Zeca Baleiro por embalar a trilha sonora da minha vida e ser companhia para todos os momentos.

Aos funcionários do departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, especialmente à Regina, à Bia e ao Fábio.

Ao Pedro Cruz pelo auxílio com a análise estatística.

À FAPESP pela concessão da bolsa e auxílio financeiro.

*“Mestre não é quem ensina, mas quem, de repente, aprende”.*

João Guimarães Rosa





## SUMÁRIO

RESUMO .....	11
ABSTRACT .....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 DESENVOLVIMENTO.....	19
2.1 Revisão de literatura .....	19
2.1.1 Panorama da agroindústria brasileira e geração de resíduos agroindustriais .....	19
2.1.2 Potencial biológico de resíduos agroindustriais .....	25
2.1.3 Substâncias bioativas: antioxidantes naturais.....	30
2.1.4 Compostos fenólicos.....	32
2.1.5 Antioxidantes e a indústria de alimentos.....	39
2.1.6 Metodologias de avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> .....	41
2.2 Material e métodos .....	47
2.2.1 Coleta das amostras .....	47
2.2.2 Preparo dos extratos dos resíduos agroindustriais.....	47
2.2.3 <i>Screening</i> de composição fenólica e atividade antioxidante .....	47
2.2.4 Análises físico-químicas.....	48
2.2.4.1 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível.....	48
2.2.4.2 Compostos fenólicos totais.....	48
2.2.5 Avaliação da atividade antioxidante.....	48
2.2.5.1 Atividade sequestrante do radical DPPH .....	48
2.2.5.2 Atividade antioxidante pelo método ABTS.....	50
2.2.5.3 Autooxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoléico .....	50
2.2.5.4 Rancimat.....	51
2.2.6 Atividade antimicrobiana .....	51
2.2.6.1 Teste de difusão em agar .....	51
2.2.7 Composição química dos extratos dos resíduos agroindustriais .....	52
2.2.7.1 Remoção de interferentes por SPE ( <i>Solid Phase Extraction</i> ).....	52
2.2.7.2 Derivatização – formação de derivados do trimetilsilil (TMS).....	53
2.2.7.3 Cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG-EM).....	53
2.2.8 Análise estatística .....	54
2.3 Resultados e discussão .....	55
2.3.1 Coleta das amostras dos resíduos agroindustriais.....	55
2.3.2 Espectrofotometria na região ultra-violeta visível.....	58

2.3.3 <i>Screening</i> de composição fenólica e atividade antioxidante.....	62
2.3.3.1 Teor de compostos fenólicos totais .....	62
2.3.3.2 Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH.....	65
2.3.4 Determinação da atividade antioxidante .....	68
2.3.4.1 EC <sub>50</sub> .....	68
2.3.4.2 Atividade antioxidante pelo método de redução do radical ABTS.....	70
2.3.4.3 Atividade antioxidante pela auto-oxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoléico .....	71
2.3.4.4 Rancimat .....	75
2.3.5 Atividade antimicrobiana.....	78
2.3.6 Composição química dos extratos de resíduos agroindustriais por CG-EM .....	78
3 CONCLUSÕES .....	91
REFERÊNCIAS.....	93

## RESUMO

### Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais

A agroindústria tem se expandido para atender a crescente demanda populacional por alimentos. Dentro deste contexto, o Brasil com sua economia fortemente baseada no agronegócio contribui para a geração de grande quantidade de resíduos agroindustriais resultantes das atividades de processamento. Estes resíduos, por sua vez, representam um grave problema, pois aparentemente sem aplicação viável, são descartados diretamente ao meio ambiente. Muitos deles são ricos em compostos bioativos, amplamente reconhecidos pelas suas propriedades promotoras de saúde e aplicações tecnológicas, tais como antioxidantes e antimicrobianos, representando, portanto, potenciais fontes naturais destas substâncias. Neste trabalho, foram analisados 15 resíduos agroindustriais coletados em Bento Gonçalves, RS, Petrolina, PE, Monte Alto e Jacareí, SP. São eles: bagaços de uva – Pinot Noir, Petit Verdot, Cabernet Sauvignon, Isabel (tintas), Moscato, Verdejo (brancas); engaços de uva – Cabernet Sauvignon; Syrah (tintas), Moscato, Verdejo (brancas); borras de vinho tinto e branco; bagaço de tomate; bagaço de goiaba e bagaço de malte. As amostras foram extraídas com solventes de diferentes polaridades (hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol:água (80:20, v/v) e água) e os extratos analisados quanto o teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH). As amostras e solventes que apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante pelo método DPPH no *screening* inicial seguiram para as outras análises de atividade antioxidante ( $EC_{50}$ , ABTS, auto-oxidação do beta-caroteno/ácido linoléico e Rancimat), atividade antimicrobiana e composição química por CG-EM. Engaço branco Moscato e bagaço Pinot Noir apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos totais, 48,61 e 40,79 mg GAE/g nos extratos etanólicos, respectivamente. O extrato etanólico do bagaço Pinot Noir apresentou elevada atividade antioxidante em todos os ensaios. Além dele, extratos de engaço branco ( $EC_{50}$ , ABTS), bagaço Petit Verdot (ABTS, auto-oxidação do beta-caroteno), engaço tinto ( $EC_{50}$ , auto-oxidação do beta-caroteno) e bagaço Cabernet Sauvignon (Rancimat) apresentaram os melhores resultados nesses ensaios, e em muitos deles, comparáveis a do antioxidante sintético BHT. Nenhuma das amostras apresentou atividade antimicrobiana na concentração de 32 mg/mL contra *S. aureus*, *S. mutans* e *A. naeslundii* pelo método da difusão em ágar. O perfil químico das amostras revelou que a epicatequina foi o composto majoritário presente tanto nos extratos etanólicos quanto aquosos de todos os resíduos vinícolas analisados. Já para os bagaços de goiaba e tomate, a quercetina foi o fenólico predominante. Outros compostos tais como ácido gálico, ferúlico, caféico, vanílico, sinápico, resveratrol, siríngico também foram identificados. Com base nos resultados é possível concluir que as amostras analisadas, particularmente os resíduos vinícolas, são ricas em compostos bioativos de elevado poder antioxidante, representando, portanto, uma potencial fonte destes compostos para aplicação na indústria de alimentos.

Palavras-chave: Resíduos vinícolas; Bagaços; Compostos fenólicos; Atividade antioxidante; Atividade antimicrobiana; CG-EM



## ABSTRACT

### Chemical composition and biological activity of agroindustrial residues

The agricultural industry has expanded to meet the growing population demand for food. Within this context, Brazil with its economy heavily based on agribusiness contributes to the generation of large amounts of industrial residues resulting from processing activities. These residues represent a serious problem because are discarded directly into the environment. Many of them are rich in bioactive compounds, widely recognized for its health-promoting properties and technological applications, such as antioxidants and antimicrobials, thus representing potential sources of these natural substances. In this study, we analyzed 15 residues collected in Bento Gonçalves, RS, Petrolina, PE, Jacareí and Monte Alto, SP. They are: grape pomace - Pinot Noir, Petit Verdot, Cabernet Sauvignon, Isabel (red), Moscato, Verdejo (white), stems of grape - Cabernet Sauvignon, Syrah (red), Moscato, Verdejo (white), wine lees red and white, tomato pomace, guava pomace and malt pomace. The samples were extracted with solvents of different polarities (hexane, chloroform, ethyl acetate, ethanol:water (80:20, v/v) and water) and the extracts analyzed for the content of total phenolics and antioxidant activity (DPPH) . The best solvents and samples selected on the basis of these two parameters followed for the other tests of antioxidant activity (EC<sub>50</sub>, ABTS, auto-oxidation of beta-carotene/linoleic acid and Rancimat), antimicrobial activity and chemical composition by GC-MS. Stems white Moscato and Pinot Noir pomace showed the highest levels of total phenolics, 48.61 and 40.79 mg GAE/g in the ethanol extracts, respectively. The ethanol extract of Pinot Noir pomace showed high antioxidant activity in all tests. Besides him, extracts of white stem (EC<sub>50</sub>, ABTS), Petit Verdot pomace (ABTS, auto-oxidation of beta-carotene), red stems (EC<sub>50</sub>, auto-oxidation of beta-carotene) and bagasse Cabernet Sauvignon (Rancimat) presented the best results of these tests, and many of them comparable to the synthetic antioxidant BHT. None of the samples showed antimicrobial activity to the concentration of 32 mg/mL against *S. aureus*, *S. mutans* and *A. naeslundii* by agar diffusion method. The chemical profile of the samples revealed that epicatechin is the major compound both in aqueous and ethanol extracts in all waste wine analyzed. In tomato and guava pomaces, quercetin is the predominant phenolic. Other compounds such as gallic acid, ferulic, caffeic, vanillic, sinapic, resveratrol, syringic were also identified. Based on these results we conclude that the samples analyzed, particularly the waste wine, are rich in bioactive compounds with high antioxidant power and have great potential application in the food industry.

Keywords: Waste wineries; Pomace; Phenolic compounds; Antioxidant activity; Antimicrobial activity; GC-MS



## 1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda social por produtos que contribuam com a melhoria da qualidade de vida, provenientes especialmente de fontes naturais, aliada à preocupação do setor industrial na tentativa de atender essa exigência, tem impulsionado pesquisas na busca de novas tecnologias, visando a promoção da saúde dos consumidores e, ao mesmo tempo, a diminuição de perdas econômicas e do impacto da atividade industrial ao meio ambiente.

Dentro deste contexto, diversas substâncias bioativas presentes naturalmente em alimentos vêm sendo estudadas e os seus benefícios à saúde cada vez mais elucidados e disseminados. Dentre elas, destacam-se os antioxidantes, substâncias capazes de combater danos oxidativos causados por radicais livres e que estão presentes em uma ampla gama de alimentos naturais e produtos alimentares (BIANCHI; ANTUNES, 1999) e as substâncias antimicrobianas, produzidas como metabólitos secundários por muitas plantas e que possuem larga aplicação nos setores farmacêutico, cosmético e nutricional, além de servirem como aditivos naturais em alimentos (BLUMA; ETCHEVERRY, 2008).

Várias destas substâncias exibem, além da atividade antioxidante e antimicrobiana, propriedades antialérgicas, antiaterogênicas, anti-inflamatórias, anti-trombóticas, bem como, efeitos cardioprotetivos e vasodilatadores (BENAVENTE-GARCIA et al., 1997; MANACH et al., 2005; MIDDLETON et al., 2000; PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2001; SAMMAN et al., 1998 apud BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Além das contribuições à saúde, estes compostos também apresentam significativa importância para a esfera industrial, já que os antioxidantes sintéticos mais usados pela indústria de alimentos como o BHA (butil-hidroxianisol), o BHT (butil-hidroxitolueno) e o TBHQ (terc-butilhidroquinona) têm despertado preocupação quanto suas doses de segurança e toxicidade (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Entretanto, não só a partir de alimentos *in natura* é possível obter esses compostos. Em todo o mundo e principalmente no Brasil, que possui sua economia fortemente baseada no agronegócio, são geradas grandes quantidades de resíduos pelas indústrias processadoras de alimentos (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003; MAKRIS; BOSKOU; ANDRIKOPOULOS, 2007), que apesar de serem considerados sérios problemas ambientais, podem servir em muitos dos casos, como fontes ricas de compostos bioativos, incluindo substâncias antioxidantes e antimicrobianas (RUBILAR et al., 2007). Assim, estes resíduos podem ser considerados fontes



potenciais desses compostos naturais (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; DIMITRIOS, 2006), de modo que, ao serem aproveitados, resultam em maiores ganhos econômicos, diminuindo simultaneamente, o impacto do descarte destes ao ambiente.

Dentre os diversos resíduos gerados pela agroindústria brasileira, destacam-se os vinícolas por serem ricas fontes de compostos fenólicos (GONZÁLES-PARAMÁS et al., 2004; TORRES; BOBET, 2001; RUBILAR et al., 2007) e pela expressiva quantidade resultante do processamento, já que a soma deles, bagaço (cascas e sementes), engaço e a borra do processo fermentativo representam em média 30% do volume de uvas utilizadas para a produção vinícola (MAKRIS; BOSKOU; ANDRIKOPOULOS, 2007). Embora recente, o setor vitivinícola brasileiro tem avançado tanto nos produtos elaborados quanto na produção de uvas destinadas ao consumo *in natura* (MELLO, 2006), o que o torna uma promissora fonte de substâncias bioativas naturais.

Ainda que os produtos da uva, sucos e vinhos, sejam mundialmente reconhecidos pela composição química que apresentam, principalmente com relação as suas substâncias antioxidantes, pesquisas envolvendo resíduos do processamento de uvas são mais recentes e representam um campo científico com muito a ser explorado. Os primeiros estudos envolvendo subprodutos da vinificação atrelaram-se quase que exclusivamente na composição polifenólica das sementes e mais atualmente tem dado-se grande importância também ao bagaço gerado. Entretanto, os demais resíduos provenientes do processo, tais como o engaço e a borra da fermentação ainda têm recebido pouca atenção (MAKRIS; BOSKOU; ANDRIKOPOULOS, 2007).

Além dos vinícolas, muitos outros resíduos são gerados pelas atividades agroindustriais. O processamento de goiaba, por exemplo, visando principalmente a produção de sucos, geléias e polpas, implica na geração residual de sementes e parte da polpa. Apesar da goiaba ser considerada uma boa fonte de antioxidantes e ácido ascórbico (LEONG; SHUI, 2002), pouco se sabe ainda sobre o valor e/ou potencial de aplicação de seus resíduos (CORREIA et al., 2004).

Outro importante material a ser considerado é o resultante das indústrias processadoras de tomate. Na América do Sul, o Brasil é líder na produção de tomates para processamento industrial, sendo também o maior consumidor de seus derivados (MELO; VILELA, 2005), implicando na geração de uma grande quantidade de resíduos (pele e semente). Assim como no caso da uva e da goiaba, pesquisas envolvendo tomate e seus compostos bioativos,

principalmente carotenóides (licopeno e beta-caroteno) e suas funções benéficas à saúde na prevenção de processos inflamatórios e doenças crônico-degenerativas, tais como certos tipos de câncer e distúrbios cardiovasculares (FRUSCIANTE et al., 2007; PESCHEL et al., 2006; JACOB et al., 2008) são amplamente disseminadas. Entretanto, estudos sobre a funcionalidade e aplicabilidade dos resíduos de tomate são escassos.

Além dos já citados, o bagaço de malte de cevada resultante do processamento cervejeiro também foi estudado. A cevada é um cereal consumido em todo o mundo, seja na sua forma *in natura* ou processada e, no Brasil, destaca-se a soma destinada à produção de cerveja, já que o País ocupa o quinto lugar em produção no mundo, com uma média de 8,5 bilhões de litros ao ano (SANTOS, 2005), gerando, portanto, um montante considerável de bagaço.

Baseado no panorama apresentado, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade biológica de resíduos agroindustriais: atividade antioxidante – por quatro diferentes métodos *in vitro* – e atividade antimicrobiana, além de identificar, por cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM), os compostos bioativos. Espera-se que os resultados gerados por este estudo sirvam de subsídios à indústria de alimentos para a utilização de antioxidantes naturais em substituição aos sintéticos resultando em benefícios à saúde humana e, ao mesmo tempo, contribuindo para a diminuição do descarte destes resíduos ao meio ambiente.



## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Revisão de literatura

#### 2.1.1 Panorama da agroindústria brasileira e geração de resíduos agroindustriais

O agronegócio brasileiro possui expressiva participação na economia do País. Representou, em 2008, cerca de 25% do total do Produto Interno Bruto (PIB) (CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA – CEPEA, 2010) e somente o setor agroindustrial, em 2002, mais de 36% em relação ao PIB total do agronegócio naquele ano (INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA – IPEA, 2004). Embora tenha se verificado quedas consecutivas nesses índices, em parte devido à crise econômica mundial que provocou retração tanto no volume como nos preços de exportação, o setor agroindustrial brasileiro mostra-se ainda muito representativo no âmbito econômico nacional (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2010).

A seguir estão apresentadas algumas esferas da agroindústria nacional, das quais originaram-se os resíduos analisados neste trabalho.

Ao tomar o setor vitivinícola brasileiro, dados do IBGE mostram que foram produzidas em 2006, 828 mil toneladas de uvas (IBGE, 2009) sendo 38,32% deste total destinado à elaboração de vinhos, sucos, destilados e outros derivados (MELLO, 2006). Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO), no ano de 2008, a produção brasileira de vinhos superou a quantia de 368 mil toneladas (FAOSTAT, 2010).

Com exceção da laranja, a uva é a cultura frutífera mais abundante do planeta. Cultivada principalmente como *Vitis vinifera*, estima-se que anualmente sejam produzidas, em todo o mundo, cerca de 61 milhões de toneladas, das quais 80% são destinadas à produção de vinho. Aproximadamente 20% deste total é representado pelo peso do bagaço (casca e semente) resultante do processamento dessas uvas, de modo que, são produzidas todo ano, mais de 9 milhões de toneladas de resíduos vinícolas (RUBERTO et al., 2007; SCHIEBER et al., 2001), o que torna este setor uma potencial fonte geradora de resíduos.

O bagaço é constituído pelas partes sólidas das uvas (casca e semente) e por uma pequena parte do mosto ou do conjunto mosto/vinho que as embebe. É o produto resultante da prensagem das massas vínicas obtidas de uvas frescas, fermentadas ou não (SILVA, 2003). Apesar de uma fração deste bagaço ser levada à destilação para a produção de uma bebida

alcoólica denominada grappa (RUBERTO et al., 2007), o montante residual descartado ainda é muito grande.

Além do bagaço são gerados outros materiais sólidos durante a vinificação. Os principais subprodutos são obtidos durante o desengace (engajo), descuba e prensagem (cascas, sementes e borra). Atualmente, somente uma pequena quantidade desse material é reaproveitado, sem qualquer pré-tratamento (RUBERTO et al., 2007). O fluxograma, a seguir, apresenta um esquema simplificado da produção de vinhos brancos e tintos e indica os pontos de geração de resíduos durante o processo.

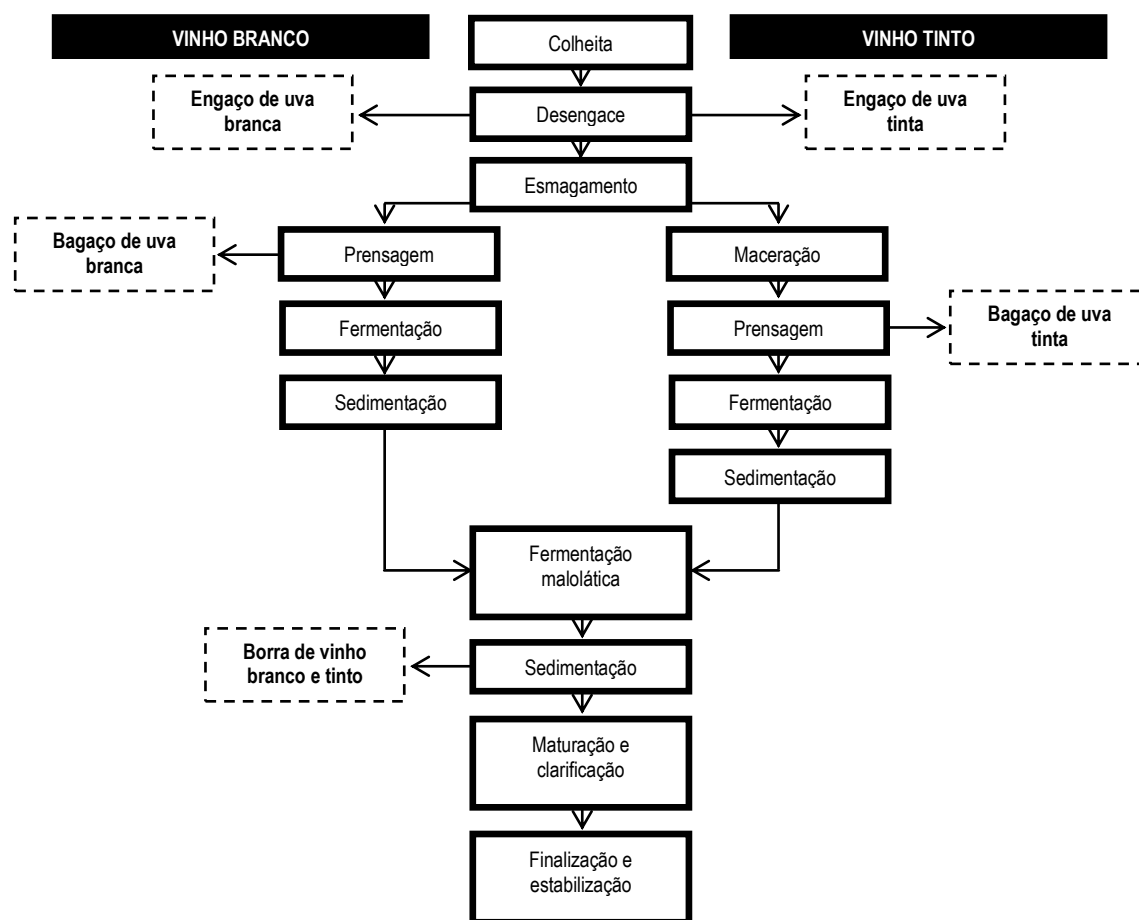


Figura 1 – Fluxograma do processamento de vinhos tintos e brancos com os respectivos pontos de geração dos resíduos vinícolas, representados por retângulos tracejados

Os engajos são os materiais menos valorizados e de difícil disposição. Quando separados por máquina apropriada – desengaçadeira –, que os separam das bagas, constituem

cerca de 3,5 – 4,5% da massa total da vindima (SILVA, 2003). A sua composição, caracterizada por elevados teores de polifenóis, torna-os impróprios para utilização como alimento para gado (RUBERTO et al., 2007). O poder calorífico do engaço é da ordem das 2000 a 2500 calorias/kg, e o seu aproveitamento como combustível é absolutamente viável. Contudo, alguns estudos já têm demonstrado sua rica composição fenólica o que dá a possibilidade de uma melhor valorização deste resíduo (SILVA, 2003).

A borra é uma massa heterogênea, que fica depositada nos recipientes que contenham vinho após a fermentação (“primeiras borras” ou “borras de fermentação”), durante a armazenagem, bem como o resíduo obtido pela filtração e/ou pela centrifugação do vinho. São também consideradas borras os resíduos que ficam depositados nos recipientes que contenham mostos de uvas. A quantidade de borra obtida anualmente depende de vários fatores que envolvem desde os inerentes à própria constituição das castas, estado de maturação e higiênico dos bagos, até aos fatores climáticos e às técnicas de vinificação adotadas. Devido à intervenção de todos estes aspectos é difícil estabelecer um valor preciso para o rendimento em borras. Estimativas apontam para uma quantia ao redor de 5% do volume total do vinho (SILVA, 2003).

Diante do cenário apresentado, a expressiva quantidade de resíduos gerados na produção de vinhos, a nível mundial, tem causado perdas econômicas e problemas ambientais na sua disposição. Frente a isso, observa-se emergir uma nova indústria comercial inserida na indústria vinícola visando o aproveitamento desses resíduos (YI et al., 2009).

Com relação ao tomate, a produção mundial para processamento industrial, em 2000, foi de 27 milhões de toneladas, aproximadamente. O Brasil é o líder sul-americano e está entre os maiores produtores mundiais (EMBRAPA, 2003; MELO; VILELA, 2005). A produção brasileira em 2008, segundo a FAO, foi de 3,93 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2010) e em 2002, somente de tomate industrial foram produzidos 1,28 milhão de toneladas (EMBRAPA, 2003). Durante seu processamento, principalmente na produção de polpa, o bagaço produzido (pele e semente) corresponde a 4% do peso total do fruto (DEL VALLE; CÁMARA; TORIJA, 2006). Diante disso, estima-se que apenas em 2002, foram geradas mais de 50 mil toneladas de bagaço de tomate no Brasil.

O fluxograma apresentado na sequência mostra o processo genérico de obtenção de polpa concentrada de tomate e o ponto de geração do resíduo.

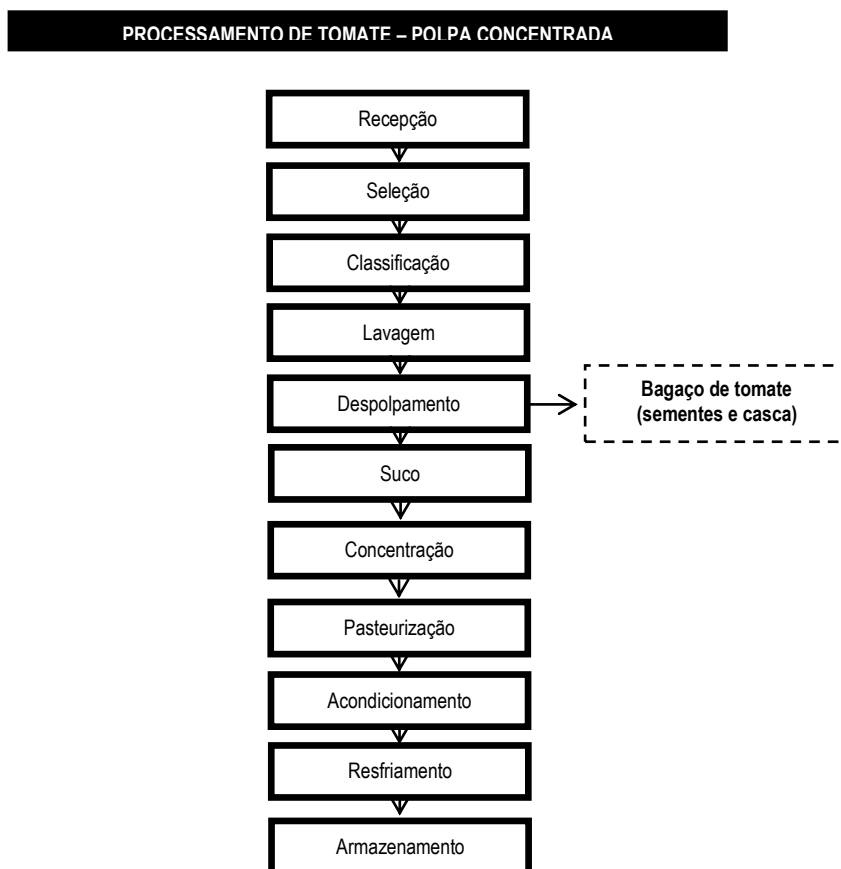


Figura 2 – Fluxograma genérico dos processos da produção de polpa concentrada de tomate e o ponto de coleta do bagaço, representado por retângulo tracejado

O Brasil cultiva ainda cerca de 16 mil hectares de goiaba e produz em torno de 345 mil toneladas da fruta, sendo um dos principais produtores mundiais (POMMER et al., 2006).

A goiaba pode ser consumida *in natura* ou industrializada, na forma de goiabada, geléias, pastas, fruta em calda, purê, alimentos para criança, base para bebidas, refrescos, sucos e xaropes. O seu consumo *in natura* ainda é pequeno, estimado em 300 gramas/per capita/ano, entretanto, a goiabada é um dos doces mais apreciados pelos brasileiros (FRANCISCO; BAPTISTELLA; AMARO, 2005).

Os resíduos do processamento de goiaba representam cerca de 10-15% da fruta. As sementes, geralmente descartadas durante a produção do suco ou polpa, contêm cerca de 5-13% de óleo rico em ácidos graxos essenciais. Pesquisas indicam que a casca e a semente da goiaba podem ser usadas como fontes de antioxidantes (SCHIEBER et al., 2001).

A figura, a seguir, mostra o fluxo genérico de produção de doce de goiaba em massa e o ponto de geração do bagaço.

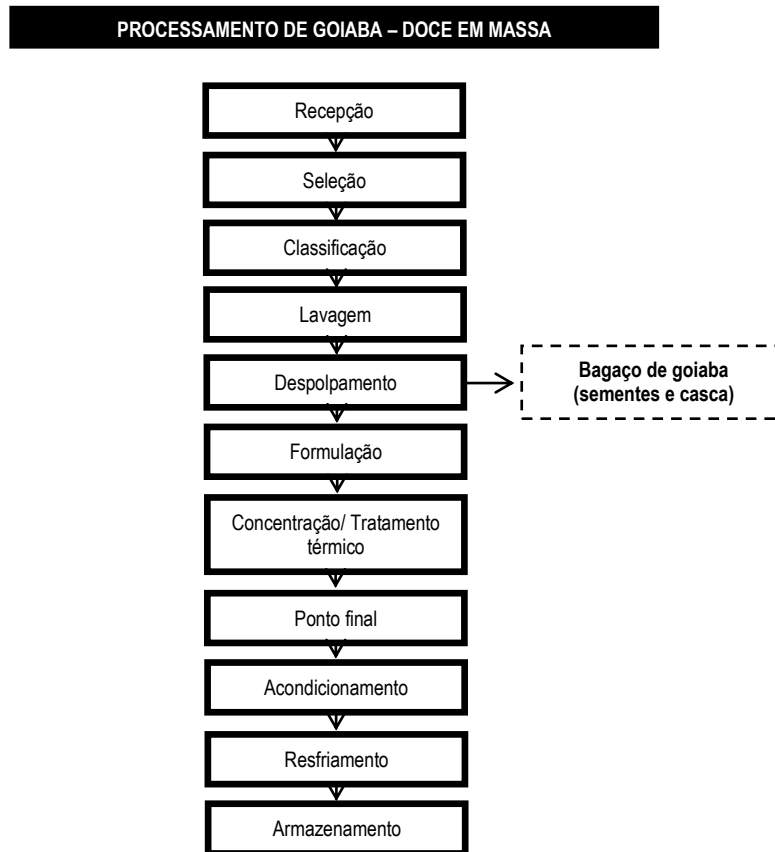


Figura 3 – Fluxograma de produção de doce de goiaba em massa e ponto de coleta do bagaço, representado por retângulo tracejado

Merece destaque ainda, pela grande quantidade gerada, o bagaço de malte de cevada produzido pelas indústrias cervejeiras. Na safra de 2007 foram produzidas mais de 133 milhões de toneladas de cevada em todo o mundo, que dentre outros destinos, serviu como matéria-prima para a produção de cerca de 173 milhões de toneladas de cerveja, sendo o Brasil responsável por aproximadamente 5,6% deste total, segundo dados da FAO (FAOSTAT, 2010). O fluxograma, a seguir, mostra as etapas de produção de cerveja e o ponto em que o bagaço de malte é gerado.



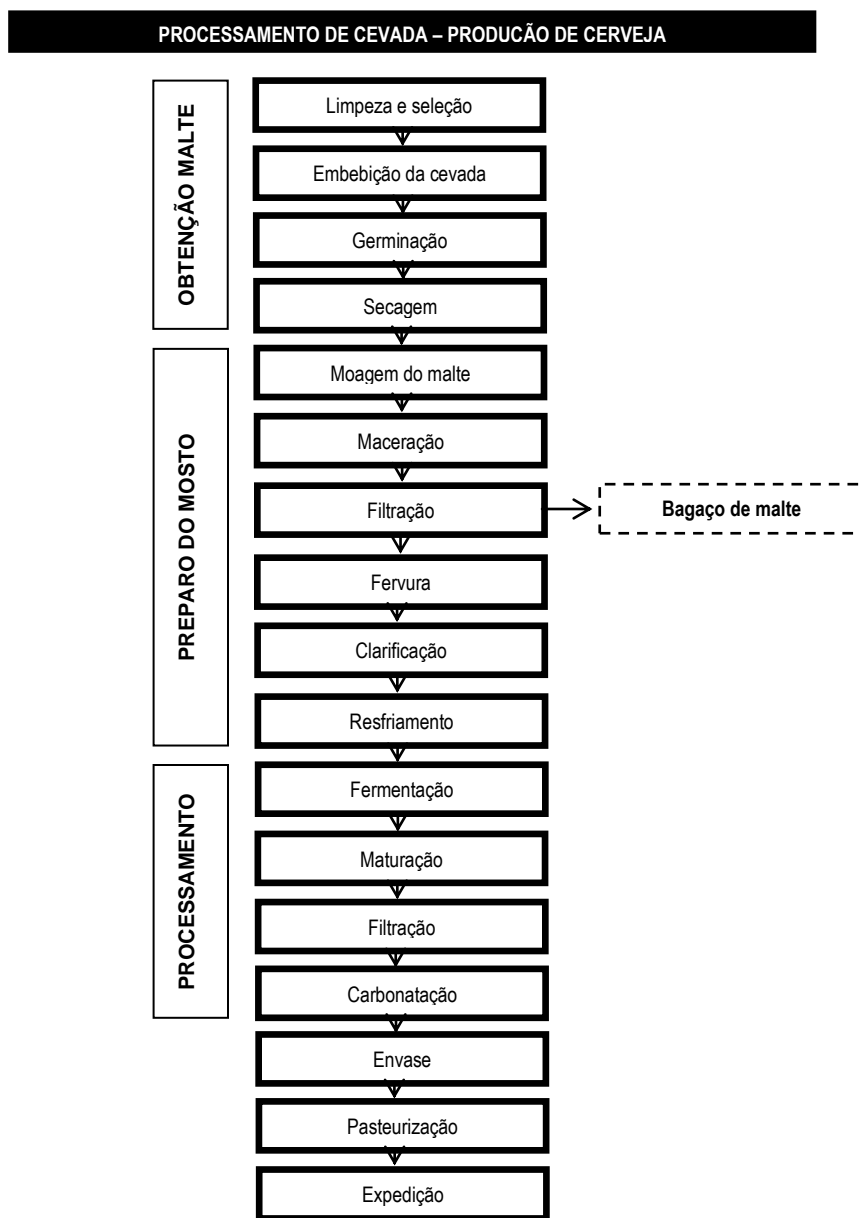


Figura 4 – Fluxograma genérico dos processos da produção de cerveja e ponto de coleta do bagaço de malte, representado por retângulo tracejado

Um dos destinos dado a esses subprodutos, além de sua disposição no campo, é a alimentação animal, que a priori, não gera benefícios econômicos para a indústria (KNOBLICH et al., 2005; DEL VALLE et al., 2007). Além disso, o descarte inadequado desses materiais pode ser a causa ou o agravante de muitos problemas ambientais (YI et al., 2009).

### 2.1.2 Potencial biológico de resíduos agroindustriais

Diversos alimentos e vegetais não têm recebido muita atenção como fontes de antioxidantes naturais, seja por sua baixa popularidade ou pelos escassos conhecimentos sobre aplicações comerciais. Entretanto, estudos indicam que a utilização de fontes não exploradas pode resultar em muitos benefícios à saúde humana (DIMITRIOS, 2006), contribuindo também, em muitos dos casos, com a diminuição de perdas econômicas e danos ambientais. Dentro deste contexto englobam-se os resíduos agroindustriais.

Merece destaque os resíduos vinícolas por serem ricas fontes de compostos fenólicos (GONZÁLES-PARAMÁS et al., 2004; TORRES; BOBET, 2001; RUBILAR et al., 2007) e pela expressiva quantidade resultante do processamento.

A riqueza fenólica desses materiais faz deles fontes de antioxidantes naturais como demonstrado por muitos estudos. Extratos de sementes de uva apresentaram elevada atividade antioxidante na análise da auto-oxidação do sistema ácido linoléico/beta-caroteno (JAYAPRAKASHA; SINGH; SAKARIAH, 2001). Ruberto et al. (2007) confirmaram o potencial antioxidante de extratos de bagaço de uva por outros dois métodos, DPPH e ABTS. Baydar et al. (2007) verificaram que extrato de semente de uva possuem maior teor de compostos fenólicos e apresentaram maior poder antioxidante quando comparado com o extrato de bagaço, sugerindo que é possível traçar uma correlação positiva entre teor de compostos fenólicos e o potencial antioxidante.

Vários estudos ainda fazem comparações entre antioxidantes naturais e os sintéticos mais utilizados pela indústria de alimentos. Na tentativa de avaliar a estabilidade e potencial antioxidante de extratos de semente e bagaço de uva, Baydar et al. (2007), verificaram que os extratos das sementes apresentaram atividade antioxidante mais elevada do que as apresentadas pelo BHA (butilhidroxianisol) e BHT (butilhidroxitolueno), quando aplicados em óleo refinado de papoula sob estocagem (oito semanas à 70 °C). A análise realizada para se chegar a tais resultados quantifica os valores de peróxidos encontrados no óleo, indicando a presença de oxidação lipídica primária e, conseqüentemente, a eficiência dos antioxidantes utilizados. Após oito semanas, todos os extratos mostraram efeito antioxidante em diferentes graus.

Extratos de semente de uva também foram testados como agente antibacteriano num estudo conduzido por Jayaprakasha, Selvi e Sakariah (2003). Os resultados encontrados mostraram que os extratos apresentaram ação inibitória contra todas as bactérias testadas num

intervalo de 850 a 1000 ppm de concentração para as gram-positivas e 1250 a 1500 ppm para as gram-negativas.

Özkan et al. (2004) avaliaram o potencial antimicrobiano dos extratos do bagaço de duas cultivares de uvas (Emir, cultivar de uva branca e Kalecik karasi, cultivar de uva tinta) e sua relação com o total de compostos fenólicos. A atividade antimicrobiana foi testada contra 14 diferentes tipos de bactérias patogênicas. Os extratos do bagaço das uvas nas concentrações de 5%, 10% e 20% foram efetivos sobre todas as bactérias testadas. Na concentração de 2,5%, a efetividade reduziu-se a 13 bactérias. De acordo com a eficácia apresentada pelos extratos, obteve-se a seqüência  $20 > 10 > 5 > 2,5 > 1\%$ . Estes autores concluíram que os resultados apresentados dependem da cultivar, do método de extração, da concentração do extrato e do ensaio utilizado para determinar o efeito antibacteriano. Além disso, levaram em consideração que outro importante fator de inibição de bactérias é a composição fenólica dos extratos, fato este também confirmado por outros autores (SHOKO et al., 1999; JAYAPRAKASHA et al., 2003; GÖKTÜRK et al., 2004; BAYDAR et al., 2004).

Em outro estudo sobre a atividade antimicrobiana de resíduos do processamento de uva realizado por Baydar e colaboradores (2004) foi analisada a ação de extratos do bagaço e sementes de uva sobre quinze bactérias patogênicas. Os extratos da semente à 4 e 20% foram os mais eficazes na inibição do crescimento de quatorze de quinze bactérias testadas. Os extratos do bagaço não apresentaram ação significativa e esses resultados podem estar atrelados a quantidade de compostos fenólicos presentes nos resíduos analisados (667,87 mg GAE/g no extrato das sementes e 45,44 mg GAE/g no extrato do bagaço). Assim, foi sugerido que os extratos de sementes de uva sejam explorados como agente antimicrobiano para prevenir a deterioração de alimentos estocados.

Os estudos acerca do potencial antioxidante e antimicrobiano de resíduos do processamento de uvas, baseiam-se, em sua maioria, na análise de extratos de bagaço e semente, porém pouco ainda se sabe sobre as características do engaço e demais resíduos gerados. Informações acerca desses materiais são mais recentes e raras. Estudo conduzido por Makris, Boskou e Andrikopoulos (2007), por exemplo, explorou além da casca e da semente de uva, também o engaço, onde encontrou quantidades significativas de compostos fenólicos em todos eles. Isso indica que esses resíduos também merecem atenção, já que possuem elevado potencial de exploração.

Alguns dos compostos bioativos, identificados por HPLC, em bagaços de uva, certamente os principais responsáveis pela atividade biológica deste resíduo, foram ácido gálico, catequina, epicatequina, resveratrol, miricetina, quercetina e kaempferol (THIMOTHE et al., 2002).

Outro importante material a ser considerado são os resíduos das indústrias processadoras de tomate. Na América do Sul, o Brasil é líder na produção de tomates para processamento industrial, sendo também o maior consumidor de seus derivados (MELO; VILELA, 2005), o que implica na geração de uma grande quantidade de resíduos (pele e semente). Assim como no caso da uva, pesquisas envolvendo tomate e seus compostos bioativos, principalmente carotenóides (licopeno e beta-caroteno) e suas funções benéficas à saúde, na prevenção de processos inflamatórios e doenças crônico-degenerativas (FRUSCIANTE et al., 2007; PESCHEL et al., 2006; JACOB et al., 2008) são amplamente divulgadas. Entretanto, estudos sobre a funcionalidade e aplicabilidade dos resíduos de tomate, ainda são escassos.

O tomate é a principal fonte de licopeno da dieta humana. Sua composição em carotenóides possui cerca de 80-90% de licopeno e 7-10% de beta-caroteno. Além disso, resíduos do processamento de tomate também apresentam compostos fenólicos ( $61,0 \pm 3,0$  mg GAE  $g^{-1}$  – pele de tomate) e elevada atividade antioxidante (PESCHEL et al., 2006). Os polifenóis presentes no tomate são principalmente ácidos fenólicos, como o ácido gálico e flavonóides como a rutina e a naringenina (FRUSCIANTE et al., 2007).

As sementes resultantes da indústria processadora de tomates representam aproximadamente 10% do volume total da fruta e 60% do total de resíduos gerados e são fontes de proteínas (35%) e lipídios (25%) (SCHIEBER et al., 2001). Os resíduos de tomate (pele e semente) possuem uma excelente composição química. De acordo com Del Valle et al. (2007), a fibra é seu maior componente (59,03%), seguido por carboidratos (25,73%), proteínas (19,27%), pectina (7,55%), lipídeos totais (5,85%) e minerais (3,92%). Além disso, os resíduos obtidos do processamento de tomate podem ser usados para a extração de diferentes compostos de alto valor nutricional e econômico, como fibras, proteínas, antioxidantes ou óleos que podem ser usados na indústria de alimentos (DEL VALLE et al., 2006).

Baseado na sua interessante composição química, nota-se uma tendência de utilização destes resíduos na nutrição humana como alimento funcional (DEL VALLE et al., 2007).

Outro resíduo a ser considerado é o bagaço de goiaba. A goiaba é uma importante fruta tropical. Sua produção mundial está estimada em cerca de 500.000 toneladas, produzidas principalmente por países da América Latina, tais como Brasil, Colômbia, México e Venezuela (JIMÉNEZ-ESCRIG et al., 2001). É uma fruta que apresenta elevados níveis de ácido ascórbico, carotenóides (goiaba vermelha) e compostos fenólicos (THAIPONG et al., 2006). Conforme já comentado anteriormente, seu processamento gera grande quantidade de bagaço, uma mistura de casca e semente.

Resultados encontrados por Jiménez-Escrig et al. (2001) após a avaliação de duas frações de goiaba (casca e polpa), mostraram que tanto a pele quanto a polpa da goiaba apresentaram altos níveis de compostos fenólicos. Os autores sugeriram que as frutas desse gênero são vegetais ricos em fibras dietéticas associadas a antioxidantes naturais podendo tornar-se um material conveniente para a produção de fibra dietética antioxidante.

Resíduos do processamento de goiaba vermelha e de mais quatro amostras foram analisados quanto ao potencial antioxidante apresentado. Os resultados mostraram que os resíduos de goiaba vermelha e casca de cacau são potenciais fontes de compostos antioxidantes e podem ser explorados como agentes preservativos ou nutracêuticos (AMIN; MUKHRIZAH, 2006).

A atividade antimicrobiana de folhas de goiaba foi testada por Jaiarj et al. (1999), apresentando forte ação inibitória sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus*. Em outro estudo, o flavonóide guaijaverina (quercetina-3-O- $\alpha$ -L-piranosídeo), extraído de folhas de goiabeira apresentou efeito inibitório contra *S. mutans* (PRABU; GNANAMAMI; SADULLA, 2006).

Embora estudos sobre a ação antimicrobiana de resíduos do processamento de goiaba sejam escassos, esse potencial pode ser estimado empiricamente pela correlação positiva já destacada por muitos autores (SHOKO et al., 1999; JAYAPRAKASHA et al., 2003; GÖKTÜRK et al., 2004; BAYDAR et al., 2004), entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antimicrobiana.

Extrato de semente de goiaba e compostos isolados a partir dela foram testados em ensaio biológico *in vitro* contra células tumorais e apresentaram resultados satisfatórios de inibição da atividade celular (SALIB; MICHAEL, 2004). Já o óleo da semente de goiaba pode ser considerado uma fonte de ácido graxo linoléico (PRASAD; AZEEMODDIN, 1994).

A cevada é um cereal cultivado e consumido em todo o mundo. Como principal matéria-prima das indústrias cervejeiras, representa grande parcela do montante de resíduos agroindustriais gerados durante a cadeia produtiva de cerveja. Embora sejam raras as pesquisas feitas diretamente com o bagaço de malte, estudos têm relatado a presença de compostos fenólicos na cevada e malte de cevada, principalmente catequina e ácido ferúlico, atividade antioxidante e a evolução destes compostos durante o processo de malteação (FERRERES et al., 2009; ZHAO et al., 2008; LIU; YAO, 2007; LU et al., 2007). Na cerveja, cerca de 80% dos compostos fenólicos presentes são provenientes do malte de cevada e o restante, do lúpulo (GOUPY et al., 1999 apud ZHAO et al., 2008).

Além dos resíduos apresentados, cascas de arroz, amêndoas, trigo, pistache são fontes importantes de antioxidantes, tais como os compostos fenólicos (RAMARATHNAM et al., 1989; WATANABE et al., 1997; TAKEOKA; DAO, 2002; BRYNGELSSON et al., 2002; GOLI et al., 2005 apud BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). As peles e cascas de frutas descartadas pelas indústrias processadoras, também são fontes ricas de antioxidantes naturais. Peles de maçã ( $48,6 \pm 0,9$  mg GAE  $g^{-1}$ ), pêssego e pêra ( $60,7 \pm 0,9$  mg GAE  $g^{-1}$ ) (PESCHEL et al., 2006), por exemplo, possuem duas vezes mais compostos fenólicos do que o conteúdo presente em suas polpas (GORINSTEIN et al., 2002; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Atenção tem sido dada da mesma forma às cascas e bagaço de laranja, uva, polpa residual de cenoura, pele de batata, folhas de oliva, folhas comestíveis, ervas culinárias, subprodutos da hidrólise de lignocelulose, subprodutos do cacau, resíduos de café, casca de cebola, entre outros (DIMITRIOS, 2006).

Embora ainda represente um campo científico que careça de pesquisas, alguns estudos já comprovam as propriedades químicas funcionais de muitos resíduos agroindustriais e seus potenciais de aplicação.

Muitas são as justificativas para o aumento das pesquisas nesta área: primeiramente pela diminuição do impacto ao meio ambiente causado pelo descarte desses subprodutos industriais; em segundo lugar, pela oportunidade de opção para a indústria em substituir os aditivos alimentares sintéticos por naturais, como forma de atender o consumidor; em terceiro, pela diminuição das perdas pela indústria com conseqüente aumento de seus rendimentos; e por último, pela promoção de uma maior taxa de aproveitamento do alimento como um todo.

### 2.1.3 Substâncias bioativas: antioxidantes naturais

Atualmente, o grande interesse em relação à diversas substâncias bioativas, particularmente os antioxidantes, deve-se aos efeitos destes compostos sobre os radicais livres e consequente benefício ao organismo.

Os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou átomos que possuem um ou mais elétrons não pareados. Esta configuração faz com que essas moléculas sejam altamente reativas e, em excesso, interfiram negativamente na manutenção de muitas funções fisiológicas normais do organismo (FERNANDEZ-PANCHON et al., 2008; BIANCHI; ANTUNES, 1999). Também conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO) ou nitrogênio ( $ERN^{1-4}$ ), esses radicais encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes no organismo. No entanto, quando em excesso, representam efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação de lipídeos de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA, estando consequentemente relacionados com várias patologias, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas e câncer, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (FERNANDEZ-PANCHON et al., 2008; BARREIROS et al., 2006). Além dos danos à saúde, interferem negativamente em aspectos tecnológicos dos alimentos por atuarem na oxidação de óleos e gorduras, diminuindo assim sua qualidade sensorial e nutricional (BARREIROS et al., 2006).

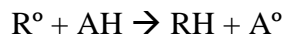
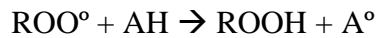
Daí a importância dos antioxidantes. De acordo com Halliwell (2000), “*antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo*”. Assim, na indústria, o processo oxidativo é retardado pela adição de antioxidantes, normalmente sintéticos e, no organismo, o excesso de radicais livres é combatido por enzimas, substâncias antioxidantes produzidas pelo corpo ou originárias da dieta.

Os antioxidantes podem agir de diferentes formas. Primeiramente, podem atuar impedindo a formação de radicais livres, inibindo as reações em cadeia com o ferro e o cobre. Outra maneira de evitar danos oxidativos é por meio da interceptação dos radicais livres impedindo que os mesmos ataquem lipídeos, aminoácidos, duplas ligações de ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA. Os antioxidantes obtidos da dieta, tais como as vitaminas C, E e A, os flavonóides e carotenóides são extremamente importantes na interceptação dos radicais

livres. Em outros casos ainda atuam como reparadores de lesões já causadas (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; BIANCHI; ANTUNES, 1999).

De acordo com o mecanismo de ação, os antioxidantes podem ser classificados em: primários e secundários, este último subdividido em sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e mistos.

Os primários são aqueles capazes de atrasar ou inibir as etapas de iniciação ou, ainda, interromper a propagação da auto-oxidação ao doarem átomos de hidrogênio, interrompendo, assim, a reação em cadeia (REISCHE et al., 2002).



Onde:  $\text{ROO}^\circ$  e  $\text{R}^\circ$  são radicais livres; AH, antioxidante com um hidrogênio ativo; e  $\text{A}^\circ$ , radical inerte.

Na reação, o átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é abstraído pelos radicais livres  $\text{R}^\circ$  e  $\text{ROO}^\circ$  mais facilmente que os hidrogênios alílicos das moléculas lipídicas insaturadas, por exemplo. O radical antioxidante produzido pela doação do hidrogênio é estabilizado por ressonância e torna-se reativamente fraco, por consequência, a taxa de propagação da oxidação é diminuída (RAMALHO; JORGE, 2006; REISCHE et al., 2002).

Os antioxidantes secundários agem por meio de muitos mecanismos. Eles diminuem a taxa de oxidação, mas não convertem radicais livres em produtos mais estáveis. Podem quelar metais pró-oxidantes e desativá-los, repor moléculas de hidrogênio para os primários, decompor hidroperóxidos em espécies não radical, desativar oxigênio singlete, absorver radiação ultravioleta ou agir como sequestradores de oxigênio (RAMALHO; JORGE, 2006; REISCHE et al., 2002).

Dentro desta classe estão os sinergistas. Eles apresentam pouca ou nenhuma atividade antioxidante, contudo, são capazes de aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando usados em combinação adequada. Ácido cítrico, ascórbico, ascorbil palmitato, lecitina e ácido tartárico são bons exemplos de sinergistas (RAMALHO; JORGE, 2006; REISCHE et al., 2002).

Já os removedores de oxigênio capturam esta molécula por meio de reações químicas estáveis tornando-as indisponíveis para atuarem como propagadoras da autooxidação. Ácido



ascórbico, seus isômeros e derivados são bons exemplos deste grupo (RAMALHO; JORGE, 2006; REISCHE et al., 2002). Os antioxidantes biológicos incluem várias enzimas, como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e redutase. Estas substâncias removem compostos altamente reativos de um sistema (RAMALHO; JORGE, 2006).

Os agentes quelantes/sequestrantes complexam íons metálicos com dois ou mais estados de valência, principalmente cobre e ferro, os quais participam como catalisadores do processo de geração de radicais livres e, por conseguinte, contribuem para a oxidação lipídica. Um par de elétrons não compartilhado na sua estrutura molecular é responsável pela complexação. Os exemplos mais comuns desta categoria são o ácido cítrico e seus sais, fosfatos e sais de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (RAMALHO; JORGE, 2006; REISCHE et al., 2002).

Os antioxidantes mistos incluem compostos de plantas e animais que têm sido amplamente estudados como antioxidantes em alimentos. Entre eles estão várias proteínas hidrolisadas, flavonóides e derivados de ácido cinâmico (ácido caféico) (RAMALHO; JORGE, 2006).

Antioxidantes podem ser sintéticos ou naturais, devendo apresentar segurança para a saúde antes de serem utilizados em alimentos, produtos farmacêuticos ou cosméticos. Dentre os antioxidantes sintéticos, destacam-se o BHA (butilhidroxianisol), o BHT (butilhidroxitolueno) e o TBHQ (terc-butilhidroquinona) e entre os naturais, o ácido ascórbico, a vitamina E, o beta-caroteno e os compostos fenólicos (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; MOURE et al., 2001).

#### **2.1.4 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos estão entre as substâncias com atividade biológica mais estudada em alimentos. Possuem no mínimo um anel aromático em sua estrutura, com uma ou mais hidroxilas como grupos funcionais. São substâncias amplamente encontradas no reino vegetal, produzidas naturalmente pelas plantas em resposta às variações ambientais (infecções, ferimentos, radiação UV etc). Abrangem cerca de 8000 compostos com diferentes estruturas químicas. Possuem influência direta sobre parâmetros sensoriais, tais como conferência de cor e adstringência (FERNANDEZ-PANCHON et al., 2008; MORAES-DE-SOUZA, 2007; OLDONI, 2007; STALIKAS, 2007).

### 2.1.4.1 Classificação

A classificação dos compostos fenólicos é feita com base na sua cadeia carbônica principal, conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1 – Classes de compostos fenólicos em plantas

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	$C_6$
Ácidos fenólicos	$C_6-C_1$
Acetofenonas, ácidos fenilacéticos	$C_6-C_2$
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides (cumarinas, isocumarinas, cromonas, fenilpropenos)	$C_6-C_3$
Naftoquinonas	$C_6-C_4$
Xantonas, benzofenonas	$C_6-C_1-C_6$
Estilbenos, antraquinonas	$C_6-C_2-C_6$
Flavonóides, Isoflavonóides e chalconas	$C_6-C_3-C_6$
Lignananas, Neolignananas	$(C_6-C_3)_2$
Diflavonóides	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Melaninas vegetais	$(C_6)_n$
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$
Taninos hidrolisáveis	$(C_6-C_1)_n$
Taninos condensados	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Fonte: BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; OLDONI, 2007

#### a. Ácidos Fenólicos

O termo “ácidos fenólicos” em geral designa fenóis que possuem um ácido carboxílico funcional. São divididos em dois grupos com estruturas diferentes: ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos. Embora o esqueleto básico seja o mesmo, os números e posições dos grupos hidroxila no anel aromático diferem (STALIKAS, 2007).

- ácidos hidroxibenzóicos

Apresentam uma estrutura básica  $C_6-C_1$ , caracterizando-se pela hidroxilação do carbono 4 do ácido benzóico. São os mais simples e mais comumente encontrados na natureza. O ácido hidroxibenzóico mais comum é o ácido gálico.

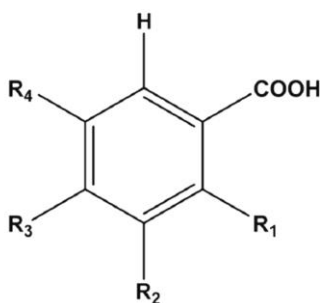


Figura 5 – Estrutura geral dos ácidos hidroxibenzoicos

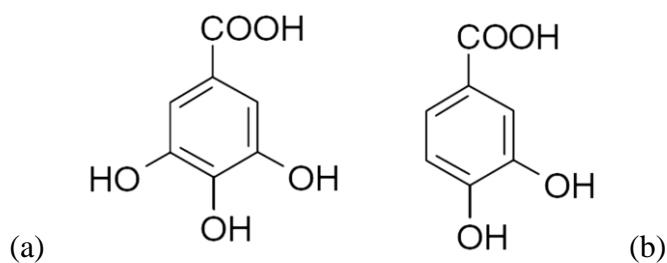


Figura 6 – Exemplos de ácidos hidroxibenzoicos. Ácido gálico (a) e Ácido protocatéuico (b)  
Fontes: STALIKAS (2007); BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, (2006)

A tabela 2 apresenta a estrutura básica dos principais ácidos hidroxibenzoicos.

Tabela 2 – Estrutura dos principais ácidos hidroxibenzoicos

Nome	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Ácido Benzóico	H	H	H	H
Ácido <i>p</i> -Hidroxibenzoico	H	H	OH	H
Ácido Vanílico	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Ácido Gálico	H	OH	OH	OH
Ácido Protocatéuico	H	OH	OH	H
Ácido Siríngeo	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
Ácido Gentísico	OH	H	H	OH
Ácido Verátrico	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
Ácido Salicílico	OH	H	H	H

Fonte: STALIKAS (2007)

- ácidos hidroxicinâmicos

Possuem uma estrutura básica C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, caracterizando-se pela hidroxilação do carbono 4 do ácido cinâmico. Os mais representativos são os ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico.

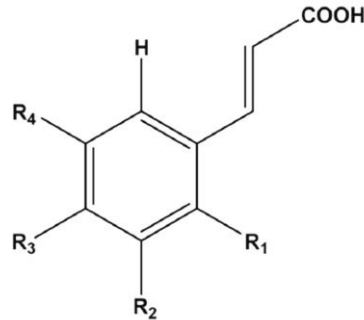


Figura 7 – Estrutura geral dos ácidos hidroxicinâmicos

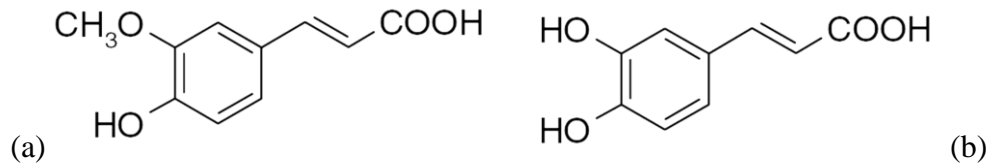


Figura 8 – Exemplos de ácidos hidroxicinâmicos. Ácido ferúlico (a) e Ácido caféico (b)  
Fonte: STALIKAS (2007); BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, (2006)

A tabela 3 apresenta a estrutura básica dos principais ácidos hidroxicinâmicos.

Tabela 3 – Estrutura dos principais ácidos hidroxicinâmicos

Nome	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Ácido Cinâmico	H	H	H	H
Ácido <i>o</i> -Cumárico	OH	H	H	H
Ácido <i>m</i> -Cumárico	H	OH	H	H
Ácido <i>p</i> -Cumárico	H	H	OH	H
Ácido Ferúlico	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Ácido Sinápico	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
Ácido Caféico	H	OH	OH	H

Fonte: STALIKAS (2007)

## b. Flavonóides

Os flavonóides estão amplamente distribuídos no reino vegetal e são os pigmentos mais comuns depois da clorofila e carotenóides. Ocorrem geralmente em plantas como derivados glicosilados e seu papel fisiológico é diverso. Devido as suas cores atrativas, flavonas, flavonóis e antocianidinas contribuem como sinais visuais para os insetos durante a polinização. Além disso, a adstringência da catequina e outros flavonóis podem representar um sistema de defesa contra insetos nocivos às plantas. Agem também como catalisadores da fotossíntese e reguladores dos canais de íons envolvidos na fosforilação. Protegem células vegetais de espécies reativas de oxigênio produzidas pelo sistema de transporte de elétrons fotossintético e, por apresentarem propriedades absorptivas de raios ultra-violeta, protegem as plantas contra a radiação UV do sol (STALIKAS, 2007).

Estruturalmente, os flavonóides são substâncias aromáticas caracterizadas por apresentarem três anéis fundidos como unidade estrutural básica. Possuem 15 átomos de carbono no esqueleto principal, do tipo  $C_6-C_3-C_6$ , no qual os dois anéis  $C_6$  são necessariamente aromáticos (anéis A e B), conectados por uma ponte de três carbonos, que geralmente contém um átomo de oxigênio (anel C).

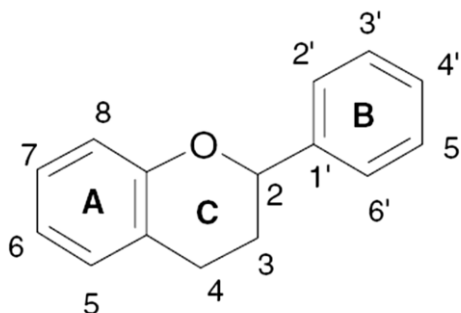


Figura 9 - Estrutura genérica de uma molécula de flavonóide  
Fonte: BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, (2006)

De acordo com suas características químicas e biossintéticas, os flavonóides são separados em diversas classes: flavonas, flavonóis, dihidroflavonóides (flavanonas e flavanonóis), antocianidinas, isoflavonóides, auronas, neoflavonóides, biflavonóides, catequinas e seus precursores metabólicos conhecidos como chalconas e podem ocorrer como agliconas, glicosilados e como derivados metilados (MORAES-DE-SOUZA, 2007; OLDONI, 2007; STALIKAS, 2007).

Esta grande diversidade estrutural e os possíveis benefícios à saúde promovidos por dietas baseadas em compostos fenólicos dependem da sua absorção e metabolismo, que são determinados pela estrutura química do composto incluindo sua conjugação com outros fenólicos, grau de glicosilação, acilação, tamanho molecular, solubilidade, hidroxilação e metilação (OLDONI, 2007; BALADUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

#### **2.1.4.2 Propriedades funcionais de compostos fenólicos**

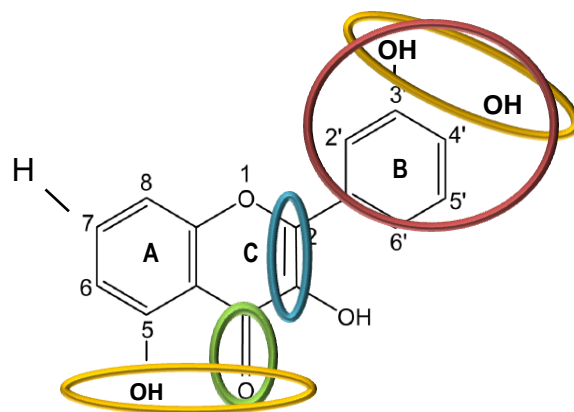
As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre determinado meio. Esta atividade, por sua vez, dependerá da estrutura química do composto, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potencial de quelação de metais) (OLDONI, 2007).

Muitas relações entre estrutura química e atividade antioxidante de compostos fenólicos podem ser traçadas. A atividade antioxidante de polifenóis depende de sua estrutura e é determinada por alguns fatores, tais como reatividade como doador de H e elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição, solubilidade e interação com as membranas (BARREIROS et al., 2006). As principais características estruturais requeridas para o sequestro eficiente de radical livre podem ser resumidas como segue:

1. O potencial antioxidante de compostos fenólicos depende do número e arranjo dos seus grupos hidroxila. Quanto maior o número de hidroxilas, maior sua capacidade de doação de H e elétrons (BARREIROS et al., 2006). Os melhores valores de atividade antioxidante na análise de ABTS para ésteres galato-catequina em relação as catequinas refletem a contribuição adicional do trihidroxibenzoato, ácido gálico (FERNANDEZ-PANCHON et al., 2008);
2. A contribuição do grupo 3-OH em flavonóides é muito significativa. Bloqueando este grupo do anel B diminui-se a atividade antioxidante (FERNANDEZ-PANCHON et al., 2008; KIOKIAS et al., 2008);
3. A estabilidade do radical livre flavanoil formado é dependente da capacidade do composto fenólico em deslocar elétrons desemparelhados. A presença de uma estrutura orto-dihidroxi (catecol) no anel B confere-lhe alta estabilidade, pois participa do

deslocamento de elétrons, desempenhando papel importante na atividade antioxidante, além de ser a estrutura mais ativa em doar átomos de hidrogênio para os radicais livres (FERNANDEZ-PANCHON et al., 2008; BARREIROS et al., 2006). Por isso, ácidos protocatéquicos e caféicos, (+)-catequina, (-)-epicatequina e quercetina, que apresentam essa estrutura, mostraram os melhores valores de ORAC dentre todos os compostos fenólicos estudados (VILLANO, 2005). A abstração do primeiro hidrogênio do grupo catecol produz um radical semiquinona transitório, que é estabilizado pelo ajuste de estruturas de ressonância e pontes de hidrogênio intramoleculares entre o radical fenoxi e a hidroxila livre. Na sequência, o segundo hidrogênio fica susceptível à abstração pelo radical livre porque uma diquinona estável é produzida. Os grupos orto-hidroxil do anel B, portanto, reagem rapidamente com dois radicais livres, enquanto as reações secundárias, atribuídas a outros elementos estruturais, são muito mais lentas (KIOKIAS et al., 2008).

4. Uma dupla ligação 2,3 em conjugação com a função 4-oxo no anel C contribui para a atividade antioxidante participando na deslocação do elétron do anel B;
5. Os grupos 3 e 5-OH com a função 4-oxo nos anéis A e C são essenciais para uma efetiva atividade de sequestro de radical, pois possibilitam pontes de hidrogênio (FERNANDEZ-PANCHON et al., 2008; KIOKIAS et al., 2008).



Grupo catecol ( - - - - - )  
 Insaturação no anel C ( - - - - - )  
 Função 4-oxo no anel C ( - - - - - )  
 Grupo 3-hidroxil ( - - - - - )

Figura 10 - Molécula do flavonol quercetina com destaque para os grupos funcionais importantes na expressão da atividade antioxidante de flavonóides

Fontes: FERNANDEZ-PANCHON et al., 2008; KIOKIAS et al., 2008; OLDONI, 2007

### 2.1.5 Antioxidantes e a indústria de alimentos

O atual nível de conhecimento sobre a prevenção da oxidação lipídica desempenhada por certos compostos químicos começou com os estudos clássicos de Moureu e Dufraise iniciados durante a I Guerra Mundial, quando testaram a atividade antioxidante de mais de 500 compostos. A partir daí, a vasta importância da oxidação em praticamente todas as etapas da produção de alimentos desencadeou a busca por aditivos químicos para controlá-la (RAMALHO; JORGE, 2006).

A oxidação lipídica em alimentos é responsável pelo processo de rancidez, caracterizado pelo desenvolvimento de odor e sabor desagradáveis, além de prejudicar a qualidade nutricional, pela degradação de vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos essenciais, e a segurança, devido a formação de compostos secundários, potencialmente tóxicos. É uma das principais razões de deterioração de alimentos durante o período de estocagem (BAYDAR; OZKAN; YASAR, 2007). Dessa forma, a adição de antioxidantes torna-se necessária para prevenir e retardar perdas, mantendo a qualidade sensorial e nutricional dos alimentos (RAMALHO; JORGE, 2006; MOURE et al., 2001).

Na seleção de antioxidantes para a indústria alimentícia, deve-se levar em consideração alguns aspectos: eficácia em baixas concentrações (0,001% a 0,01%); ausência de interferências indesejáveis nos parâmetros sensoriais característicos do alimento; compatibilidade com a matriz alimentar a qual será aplicado e facilidade de aplicação; estabilidade nas condições de processo e armazenamento e segurança de ingestão do composto e seus produtos de oxidação mesmo se ingeridos em doses maiores do que as geralmente ingeridas nos alimentos. Além disso, é prudente considerar a legislação vigente, custo de aplicação e preferência de mercado por antioxidantes sintéticos ou naturais (RAMALHO; JORGE, 2006).

Antioxidantes sintéticos como o BHT (butilhidroxitolueno), BHA (butilhidroxianisol), PG (propilgalato) e TBHQ (terc-butilhidroquinona) são amplamente usados como aditivos alimentares a fim de aumentar a vida útil dos alimentos, especialmente os ricos em óleos e gorduras, por meio do retardo do processo de peroxidação lipídica (BAYDAR; OZKAN; YASAR, 2007).



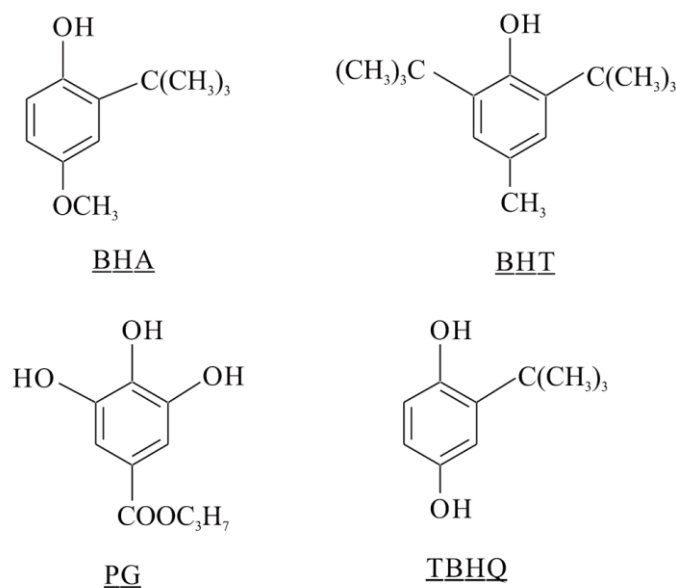


Figura 11 – Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos mais utilizados pela indústria de alimentos

A estrutura fenólica desses antioxidantes primários (Figura 11) permite a doação de um hidrogênio ao radical livre interrompendo a propagação da oxidação. Após a doação do próton, tornam-se radicais estáveis sem promover ou propagar reações oxidativas (RAMALHO; JORGE, 2006).

Entretanto, muitos estudos reavaliam a segurança desses antioxidantes e revelam que eles podem ser tóxicos dependendo da dose e do tempo de exposição. Tanto o BHT quanto o BHA são conhecidos não somente pelos efeitos tóxicos e carcinogênicos em humanos, mas também por desencadear anormalidades nos sistemas enzimáticos (ITO et al., 1986; WICHI et al., 1988; INATANI; NAKATANI; FUWA, 1983 apud BAYDAR; OZKAN; YASAR, 2007). Atrelado à este fator, a crescente precaução dos consumidores quanto à segurança de aditivos alimentares aumenta a necessidade de identificação de novas alternativas provenientes de fontes naturais que representem segurança à saúde humana (DEMIRCI et al., 2007).

Diante disso, a crescente demanda pela substituição de antioxidantes sintéticos pelos naturais pode representar benefícios devido as suas implicações à saúde, prevenindo o envelhecimento precoce, além de vários distúrbios relacionados ao estresse oxidativo, tais como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas (DIMITRIOS, 2006) e danos ao DNA, os quais podem desempenhar papel primordial no desencadeamento da mutagênese e carcinogênese (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Além disso, vários estudos têm comprovado a eficácia de

antioxidantes naturais em comparação aos sintéticos (BAYDAR; OZKAN; YASAR, 2007; LAFKA; SINANOGLU; LAZOS, 2007). Apresentam também vantagem tecnológica devido sua solubilidade tanto em óleo quanto em água, o que é um aspecto muito importante em sistemas alimentares, principalmente para emulsões (MOURE et al., 2001).

Compostos naturais com atividade antimicrobiana também podem ser usados como conservantes microbiológicos, evitando a deterioração precoce dos alimentos, além de apresentarem ampla aplicação na indústria farmacêutica e cosmética (MICHELIN et al., 2005).

### **2.1.6 Metodologias de avaliação da atividade antioxidante *in vitro***

Diversas técnicas têm sido empregadas para avaliar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e materiais potencialmente interessantes. A realização de mais de um ensaio é altamente recomendado, uma vez que os princípios dos métodos variam de acordo com a matriz de reação. Além disso, antioxidantes podem se comportar de diferentes maneiras em resposta à diferentes radicais ou fontes oxidantes. Na sequência, são abordados os quatro métodos utilizados neste trabalho para avaliar a atividade antioxidante dos resíduos agroindustriais.

#### **2.1.6.1 DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil)**

Este método tornou-se o mais popular para análise de antioxidantes naturais. Uma das razões para isso acontecer é que trata-se de um ensaio simples e de alta sensibilidade (MOON; SHIBAMOTO, 2009). Entretanto, são utilizadas quantidades significativas de reagentes, padrões e amostras, além disso, apresenta limitações em relação ao número de análises simultâneas que podem ser realizadas (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

O DPPH é um radical livre, de nitrogênio orgânico, estável, adquirido comercialmente e pronto para ser usado. É dissolvido somente em solventes orgânicos (especialmente em meio alcoólico), mas não em meio aquoso, o que configura uma limitação, ao levar-se em consideração o papel dos antioxidantes hidrofílicos (ARNAO, 2000).

O ensaio baseia-se no descolorimento de uma solução composta por DPPH<sup>o</sup> de cor violeta quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio ao radical, tornando o meio amarelo, numa reação estequiométrica (Figura 12). Assim, o efeito antioxidante é proporcional ao desaparecimento da molécula de DPPH<sup>o</sup> do meio de reação. Muitas formas de se

monitorar esse descolorimento podem ser empregadas, contudo, o uso de espectrofotômetro é o modo mais comum e o mais adotado, pela sua simplicidade e exatidão. O radical DPPH apresenta o máximo de absorção a um comprimento de onda de 517 nm (coloração violeta) (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

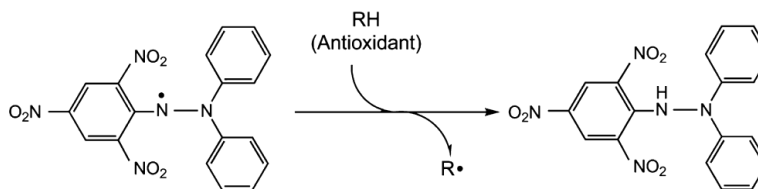


Figura 12 – Reação entre a molécula de DPPH<sup>o</sup> e um antioxidante para formar DPPH reduzido.  
Fonte: MOON; SHIBAMOTO, 2009

Os resultados podem ser expressos em porcentagem de atividade antioxidante, micromols de equivalentes do padrão utilizado (trolox, por exemplo) ou ainda como EC<sub>50</sub>, que é a quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de radical livre do meio em 50% (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

### 2.1.6.2 ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)

O radical livre ABTS necessita ser gerado por reações enzimáticas (peroxidase, mioglobina) ou químicas (dióxido de manganês, persulfato de potássio), ao contrário do DPPH, já adquirido pronto para o uso. Este método tem sido aplicado para medir a atividade antioxidante de soluções de substâncias puras, misturas aquosas e bebidas. Pode ser usado em uma ampla faixa de pH, inclusive para estudar efeitos de sua variação em mecanismos antioxidantes (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Uma vantagem em relação ao método anterior é que pode ser dissolvido tanto em meio aquoso quanto orgânico, de forma que torna mais apurada a medida da atividade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos (ARNAO, 2000).

O ensaio original era baseado na ativação da metamioglobina com peróxido de hidrogênio na presença de ABTS para formar o radical cátion, com ou sem antioxidantes participando da reação. Entretanto, esse método recebeu críticas quanto as interferências causadas pela presença de antioxidantes, os quais poderiam contribuir para a redução do radical formado, devido a rapidez com que ocorre a reação. Assim, o método sofreu alterações de forma que o radical livre fosse formado diretamente em uma forma estável e antecipadamente à adição do antioxidante. A formação do radical livre ABTS, de coloração azul-esverdeada, dá-se, então, pela

oxidação do ABTS pelo persulfato de potássio (Figura 13), com absorção máxima nos comprimentos de onda de 645 nm, 734 nm, 815 nm e 415 nm. A adição de antioxidantes ao radical pré-formado reduz o ABTS a uma intensidade e escala de tempo que depende da atividade antioxidante, da concentração e da duração da reação. A atividade antioxidante é determinada pelo descoloramento do ABTS, que ocorre a medida que o radical é reduzido (MOON; SHIBAMOTO, 2009; RE et al., 1999).

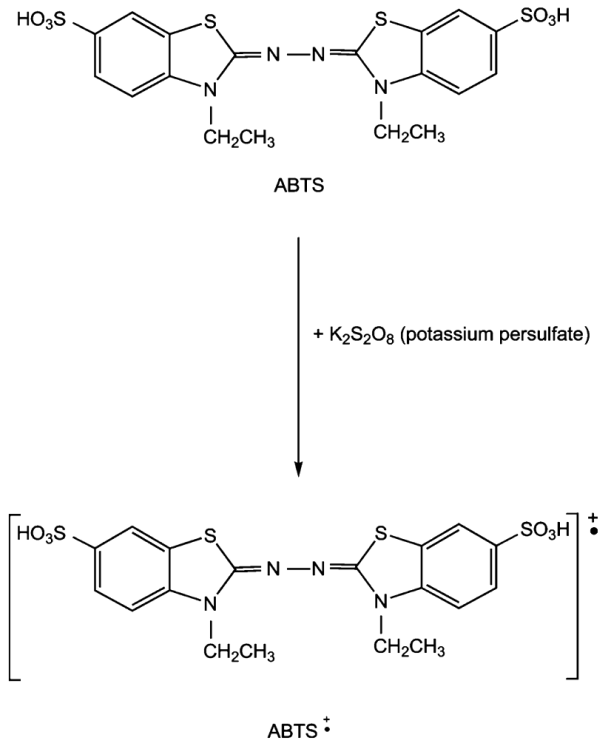


Figura 13 – Formação do radical ABTS pela sua oxidação com persulfato de potássio  
Fonte: MOON; SHIBAMOTO, 2009

A absorbância da mistura da reação entre o radical ABTS e o antioxidante é comparada a um padrão, normalmente o Trolox, e a atividade antioxidante é expressa em termos de capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

### 2.1.6.3 Auto-oxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoléico

O método de oxidação do beta-caroteno/ácido linoléico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. O método fundamenta-se em medidas espectrofotométricas (comprimento de onda à 470 nm) da descoloração (oxidação) do

beta-caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico, acelerada em testes *in vitro*, neste caso, pela temperatura e presença de oxigênio no meio de reação (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Os carotenóides podem descorar via auto-oxidação, oxidação induzida por luz ou calor ou por radicais peroxila. Esse processo pode ser diminuído ou prevenido por antioxidantes que doam átomos de hidrogênio para estabilizar os radicais livres. Portanto, este método determina o potencial de uma amostra ou composto em proteger um substrato lipídico da oxidação (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

É um ensaio que difere dos demais já discutidos até o momento, pois a matriz de reação é uma emulsão. O comportamento de muitos antioxidantes pode mudar ante o meio em que se encontram. Em emulsões óleo em água observa-se maior eficácia protetora de antioxidantes lipofílicos. Já em sistemas lipídicos, antioxidantes hidrofílicos apresentam melhor atividade. A esse fenômeno dá-se o nome de “paradoxo polar” (Figura 14). Isso acontece pois no óleo, os antioxidantes hidrofílicos são orientados para a interface óleo-ar, promovendo melhor proteção quando comparados aos lipofílicos que ficam solubilizados no óleo. Ao contrário, em emulsões, os lipofílicos são mais protetivos por serem direcionados na interface óleo-água (KIOKIAS; VARZAKAS; OREOPOULOU, 2008).

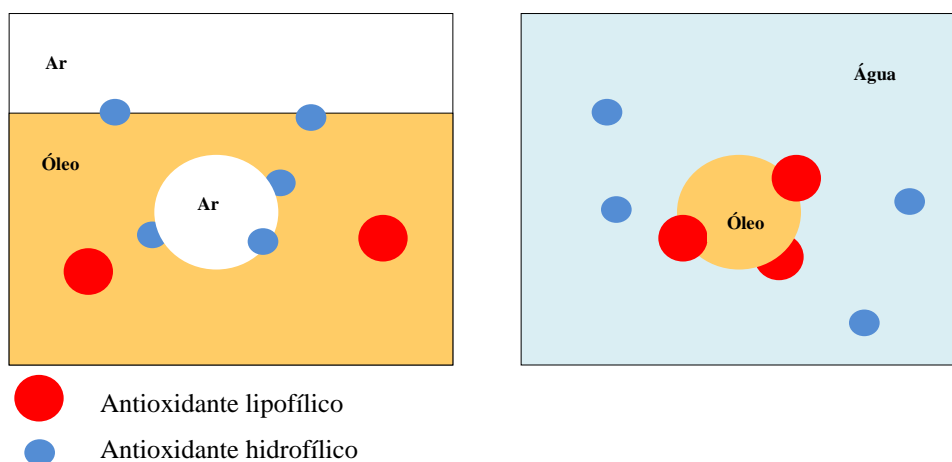


Figura 14 – Distribuição interfacial dos antioxidantes em um sistema contendo óleo (à esquerda) e emulsão óleo em água (à direita).

Fonte: KIOKIAS; VARZAKAS; OREOPOULOU (2008); PRADO (2009)

Assim como em outros métodos, esta metodologia utiliza quantidades significativas de reagentes, padrões e amostras. Apresenta limitações em relação ao número de análises simultâneas que podem ser realizadas e possui pontos críticos, como o controle de temperatura, por exemplo (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

#### **2.1.6.4 Rancimat**

A oxidação lipídica é uma das principais causas da perda de qualidade em alimentos. Diante disso, realçam-se as reações que previnam a propagação da peroxidação ou que removam radicais livres. Os antioxidantes, tais como os compostos fenólicos, reagem com os radicais lipídicos ao doarem um átomo de hidrogênio, formam produtos não reativos, e por fim, param a fase de propagação oxidativa (FARHOOSH et al., 2008; APARICIO et al., 1999).

Métodos rápidos têm sido empregados para avaliar a resistência de óleos e gorduras à oxidação, além de comparar a atividade antioxidante de muitos compostos bioativos em sistemas lipídicos. Todos esses métodos envolvem altas temperaturas, já que a razão da reação oxidativa é exponencialmente afetada por esse parâmetro. Entre eles, o ensaio Rancimat tem tornado-se muito popular e frequentemente usado devido ao seu fácil manuseio e alta reprodutibilidade (FARHOOSH et al., 2008).

Esse teste fundamenta-se na determinação automática do tempo transcorrido para se atingir a taxa máxima de oxidação de um óleo. Também chamado de período de indução ou índice de estabilidade oxidativa do óleo, é determinado pelo aumento da condutividade da água deionizada, em função dos compostos finais da oxidação do óleo nela borbulhados (FARHOOSH et al., 2008).



## **2.2 Material e métodos**

### **2.2.1 Coleta das amostras**

No primeiro semestre de 2009 foram coletados os seguintes resíduos agroindustriais: engaços de uva tinta (variedade Cabernet Sauvignon) e branca (variedade Moscato), bagaços de uva das variedades Cabernet Sauvignon, Pinot Noir e Moscato (*Vitis vinifera*) e Isabel (*Vitis Labrusca*) e borra da fermentação de vinho branco provenientes do processamento vinícola de uvas da região de Bento Gonçalves, RS, fornecidos pela Embrapa Uva e Vinho; resíduo proveniente do processamento de goiaba (bagaço) fornecido pela Cepêra - Agro Industrial Ibitirama Ltda, empresa localizada no município de Monte Alto, SP; e bagaço de cevada resultante do processamento de indústria cervejeira localizada em Jacareí, SP.

No segundo semestre de 2009 foram coletados bagaços de uva tinta da variedade Petit Verdot e branca da variedade Verdejo, engaços de uva tinta (variedade Syrah) e branca (variedade Verdejo) (*Vitis vinifera*) e borra de vinho tinto na Embrapa Semi-Árido em Petrolina, PE, além de bagaço de tomate na Cepêra - Agro Industrial Ibitirama Ltda, que se somaram aos resíduos já coletados anteriormente compondo um total de 15 amostras. Logo após a coleta, os resíduos foram liofilizados, homogeneizados, pesados e armazenados à -18°C.

### **2.2.2 Preparo dos extratos dos resíduos agroindustriais**

Os extratos dos resíduos foram obtidos em triplicata, como descrito por Bloor (2001) e preparados em escala laboratorial com o emprego de solventes de diferentes polaridades (hexano; clorofórmio; acetato de etila; etanol:água (80:20 v/v) e água).

Inicialmente foi pesado 1 g de cada resíduo liofilizado, obtido conforme o item 2.2.1, e adicionado 10 mL de cada solvente. A extração foi conduzida em ultrassom, à temperatura ambiente, durante 15 minutos. Após isto, o extrato foi centrifugado a 5000 x g durante 15 minutos e o sobrenadante utilizado para as análises subsequentes.

### **2.2.3 Screening de composição fenólica e atividade antioxidante dos resíduos agroindustriais**

O *screening* de composição fenólica e atividade antioxidante foi realizado como teste preliminar para seleção de solventes e amostras com maior potencial bioativo. Para tanto, foram feitas análises de compostos fenólicos totais e de atividade antioxidante pelo método de sequestro



do radical livre DPPH, metodologias descritas posteriormente nos itens 2.2.4.2 e 2.2.5.1, respectivamente. Os melhores solventes para extração de compostos antioxidantes e os resíduos mais promissores em relação a este aspecto seguiram para as demais análises físico-químicas e de avaliação da atividade antioxidante.

## **2.2.4 Análises físico-químicas**

### **2.2.4.1 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível**

Os espectros de absorção foram obtidos de acordo com o método descrito por Alencar et al. (2005). Os extratos dos resíduos, obtidos de acordo com o item 2.2.2, foram diluídos em seus respectivos solventes e os espectros de absorção na região UV-visível foram determinados na faixa de comprimento de onda de 200 a 500 nm.

### **2.2.4.2 Compostos fenólicos totais**

A análise de compostos fenólicos totais dos extratos dos resíduos foi feita de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton et al. (1999), utilizando ácido gálico como padrão.

O reagente de Folin-Ciocalteu é uma solução complexa de íons poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W. Os extratos obtidos foram diluídos e, uma alíquota de 0,5 mL da amostra diluída foi transferida para um tubo e adicionado 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu, diluído em água 1:10. A mistura permaneceu em repouso por 3 a 8 minutos. Em seguida adicionou-se 2 mL de carbonato de sódio 4% e os tubos foram deixados em repouso por 2 horas ao abrigo da luz. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 740 nm. Uma amostra em branco foi conduzida nas mesmas condições e os resultados dos compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente de ácido gálico.

## **2.2.5 Avaliação da atividade antioxidante**

### **2.2.5.1 Atividade sequestrante do radical DPPH**

A medida da capacidade sequestrante determinada pelo método DPPH baseia-se no princípio de que o DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil), um radical de coloração violeta, aceita um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula estável, sendo reduzido na

presença de um antioxidante e adquirindo coloração amarela. Na forma de radical, o DPPH possui absorção característica a 517 nm, que desaparece à medida que ele vai sendo reduzido pelo hidrogênio doado por um composto antioxidante (MENSOR et al., 2001). Foram utilizados padrões de  $\alpha$ -tocoferol e BHT na concentração de 100 ppm. A mistura de reação foi constituída pela adição de 500  $\mu$ L dos padrões ou extratos dos resíduos agroindustriais, 3,0 mL de etanol 99% e 300  $\mu$ L do radical DPPH em solução de etanol 0,5 mM. O tempo de reação foi de 45 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A atividade anti-radical foi determinada na forma de Atividade Antioxidante (AA), pela eq. (1):

$$AA(\%) = 100 - \left( \frac{((Aa - Ab) \times 100)}{Ac} \right) \quad (1)$$

Onde:

Aa = absorbância da amostra

Ab = absorbância do branco

Ac = absorbância do controle negativo

O controle negativo foi feito substituindo-se o volume do extrato por igual volume do solvente utilizado na extração. O branco foi preparado substituindo o volume da solução de DPPH por igual volume de solvente.

As amostras selecionadas no *screening* foram submetidas ao ensaio EC<sub>50</sub> para análise da atividade antioxidante. Este método permite conhecer a concentração mínima necessária para que a amostra em estudo seja capaz de reduzir em 50% o radical livre DPPH inicial da reação.

A cinética dos extratos dos resíduos foi monitorada a cada 20 minutos durante 120 minutos em função do declínio da absorbância da solução de DPPH a 517 nm. As concentrações utilizadas na reação foram feitas a partir do extrato bruto à 10% .

O EC<sub>50</sub> das amostras foi calculado por regressão linear dos gráficos em que o eixo das abscissas representou a concentração dos extratos e o eixo das ordenadas o percentual de atividade antioxidante.

### 2.2.5.2 Atividade antioxidante pelo método ABTS

A atividade antioxidante pelo método ABTS foi feita conforme metodologia descrita pela Embrapa (2007). O radical ABTS•<sup>+</sup> foi formado pela reação de ABTS 7 mM com persulfato de potássio 140 mM, incubados à temperatura de 25 °C e no escuro, durante 12 - 16h. Uma vez formado, o radical foi diluído com etanol até a obtenção do valor de absorvância de  $0,700 \pm 0,200$  a 734 nm. A partir dos extratos dos resíduos, obtidos conforme o item 2.2.2, foram preparadas três diluições diferentes em triplicata. Em ambiente escuro, um volume de 3,0 mL da solução de radical ABTS•<sup>+</sup> foi acrescentado a 30 µL de cada diluição dos extratos e as absorvâncias lidas após seis minutos em espectrofotômetro a 734 nm, utilizando etanol 100% como branco. Para a construção da curva padrão foi utilizado o Trolox, um antioxidante sintético análogo à vitamina E, nas concentrações de 100 – 2000 µM. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em µM trolox/g de resíduo.

### 2.2.5.3 Autoxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoléico

A medida da atividade antioxidante pela oxidação acoplada do beta-caroteno e do ácido linoléico, foi realizada de acordo com o método de Emmons et al. (1999), com algumas modificações. Pesou-se 10 mg de beta-caroteno, que foram dissolvidos em 100 mL de clorofórmio. Após isto, foi retirada uma alíquota de 3 mL da solução clorofórmio/beta-caroteno e adicionado 40mg de ácido linoléico e 400 mg de Tween 40. Em seguida, o clorofórmio foi removido com a utilização de uma corrente de gás nitrogênio e o resíduo obtido redissolvido em 100 mL de água aerada por 30 minutos. Alíquotas de 3 mL da emulsão beta-caroteno/ácido linoléico foram misturadas com 50 µL dos extratos dos resíduos agroindustriais, na diluição 1:10 (extrato:solvente, v/v), e incubadas em banho-maria a 50°C. A oxidação da emulsão foi monitorada em espectrofotômetro a 470 nm, no tempo inicial e em intervalos de 20 minutos durante 2 horas. Para a amostra controle utilizou-se solvente no lugar do extrato dos resíduos. Foram utilizados padrões de BHT e  $\alpha$ -tocoferol em concentrações de 100 ppm. A atividade antioxidante (AA) foi expressa como percentual de inibição relativa comparada ao controle depois de 120 minutos usando a eq. (2):

$$AA(\%) = \frac{(DRc - DRs)}{DRc} \times 100$$

(2)

Onde:

DRc = taxa de degradação do controle (=  $\ln(a/b)/120$ )

DRs = taxa de degradação na presença do padrão ou extrato (=  $\ln(a/b)/120$ )

“a” e “b” são as absorvâncias no tempo inicial (0 min) e no tempo final (120min), respectivamente.

#### 2.2.5.4 Rancimat

O método Rancimat foi realizado de acordo com o descrito por Murcia et al. (2001) com algumas modificações. Inicialmente, aplicou-se um volume dos extratos etanólicos dos resíduos no óleo de forma que a concentração final em 5 g de óleo de soja (sem antioxidantes) fosse equivalente a 100 ppm de compostos fenólicos. A avaliação do fator de proteção foi medida em um Rancimat modelo 743 (Metrohm AG, CH 9100 Herisau Switzerland). A determinação do período de indução foi baseada na detecção de ácidos voláteis a  $110 \pm 1^\circ\text{C}$ , com fluxo de ar seco a taxa de 9 litros/h, conforme o método cd 12b-92 (AOCS, 2003). Um controle negativo (óleo de soja sem adição de amostra) e um controle positivo (óleo de soja com adição do antioxidante sintético BHT a 100 ppm) foram submetidos a análise. A atividade antioxidante foi expressa pelo Fator de Proteção (PF), usando a eq. (3):

$$PF = \frac{PIa}{PIc} \quad (3)$$

Onde:

PIa = Período de indução do óleo com os extratos ou padrões

PIc = Período de indução do controle (óleo sem os extratos ou padrões)

### 2.2.6 Atividade antimicrobiana

#### 2.2.6.1 Teste de difusão em agar

Este teste trata-se de uma prova rápida de susceptibilidade a antimicrobianos, essencialmente qualitativa. O método utilizado foi o descrito por Koo et al. (2000) e Duarte et al. (2003). *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600 e *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104 foram reativados a partir da cultura estoque em meio BHI líquido por 18-24 h a  $37^\circ\text{C}$ , 10%  $\text{CO}_2$  e posteriormente cultivado em placas BHI agar. Após o crescimento

bacteriano, as colônias individuais foram removidas com auxílio de uma alça de platina e suspensas em uma solução de NaCl 0,89% estéril. Após a homogeneização, a suspensão bacteriana foi ajustada em espectrofotômetro para o valor de absorbância de 0,135 a 660 nm, o que equivale a  $1-2 \times 10^8$  UFC/mL. Uma alíquota de 500  $\mu$ L da suspensão bacteriana foi inoculada em 50 mL de agar BHI a 45°C, sendo a mistura homogeneizada através de um agitador magnético. Após isto, o meio inoculado foi imediatamente distribuído em placas de Petri. Os procedimentos de inóculo foram suficientes para obter crescimento semi-confluyente. Foram colocados cinco cilindros de aço inoxidável esterilizados com 6 mm de diâmetro interno (8mm de diâmetro externo x 10mm de espessura x 10mm de altura) sobre a superfície do ágar semeado, após a total solidificação do meio. Com o auxílio de uma pipeta, um volume de 40  $\mu$ L dos extratos (na concentração de 32 mg/mL), controle positivo (clorexidina 0,12% v/v) e controle negativo (solvente de extração) foram colocados no interior de cada cilindro. As placas ficaram em repouso por 2 horas na temperatura ambiente para permitir a difusão dos extratos e, após esse procedimento, foram incubadas por 24 horas. As zonas de inibição de crescimento bacteriano foram medidas com auxílio de um paquímetro digital, sendo comparadas aos seus respectivos controles.

## **2.2.7 Composição química dos extratos dos resíduos agroindustriais**

### **2.2.7.1 Remoção de interferentes das amostras por meio da técnica SPE (*Solid Phase Extraction*)**

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica empregada para purificação de amostras complexas, principalmente quando se deseja eliminar interferentes, como açúcares, por exemplo. É uma técnica cada vez mais utilizada, pois é rápida, eficaz e utiliza pouco volume de amostra e solvente.

Os extratos etanólicos dos resíduos agroindustriais foram primeiramente evaporados em rotaevaporador (45 °C) para eliminação do solvente orgânico, sendo, em seguida, rediluídos com água até o volume original e, assim como os extratos aquosos, acidificados até o pH 2. Antes da aplicação das amostras, cartuchos SPE-LC18 (Supelco, 2 gramas) foram condicionados com metanol e água ácida (pH 2). Alíquotas de 7 mL dos extratos foram então aplicadas aos cartuchos, os quais foram lavados com 15 mL de água ácida. Após isto, os compostos adsorvidos

foram eluídos com metanol 100% e a fração foi coletada em *vial* silanizado, evaporada com corrente de nitrogênio, para na sequência ser derivatizada.

#### **2.2.7.2 Derivatização – formação de derivados do trimetilsilil (TMS)**

Previamente a realização da análise do perfil químico pela técnica de cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (CG-EM), as amostras passaram por uma etapa imprescindível chamada derivatização. A cromatografia gasosa é útil para analisar gases, substâncias voláteis e termicamente estáveis. Quando a amostra não apresenta esse perfil, sendo constituída principalmente por compostos de alta massa molar e/ou grupos funcionais fortemente polares, há necessidade de derivatização – reação que transforma as substâncias de interesse em derivados com características adequadas à análise (BONATO, 2006).

Às frações obtidas na purificação por SPE adicionaram-se 100 µL do reagente derivatizante N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA). A mistura foi homogeneizada e levada em estufa à 70°C durante 10 minutos para reação. Em seguida, o reagente foi evaporado sob fluxo de gás nitrogênio e o produto da derivatização (derivados do trimetilsilil – TMS) foi rediluído em hexano (600 a 800 µL). Após homogeneização, o sobrenadante foi transferido a outro *vial* para injeção em CG-EM.

#### **2.2.7.3 Cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG-EM)**

As análises por CG-EM dos extratos foram conduzidas em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 2010 acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu QP 2010 *Plus*. As amostras foram separadas em coluna capilar (RTX5MS 30m x 0,25mm x 0,25 µm). A programação de temperatura iniciou em 80°C (1 minuto), a taxa de aquecimento de 20°C/minuto alcançou 250°C (1 minuto), passou a 300°C (5 minutos) a taxa de 6°C/minuto, a 310°C (5 minutos) a taxa de 15°C/minuto, a 320°C (10 minutos) a taxa de 20°C/minuto, totalizando 40 minutos de análise. Hélio foi utilizado como gás de arraste. A temperatura do injetor foi de 280°C e o volume de injeção foi de 0,5 µL no modo “*splitless*”. A interface foi mantida a 280°C e o detector operou no modo “*scanning*” (*m/z* 40-800). A integração foi feita por meio do *software* LabSolutions-GCMS. Flavonóides, ácidos fenólicos e derivados foram identificados por comparação com os dados obtidos do CG-EM (tempo de retenção e fragmentação iônica) de padrões autênticos silanizados e eluídos nas mesmas condições e com a biblioteca Wiley 8.

### **2.2.8 Análise estatística**

A análise estatística foi feita por meio do *software* SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 2002). Para a comparação das médias, utilizou-se o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

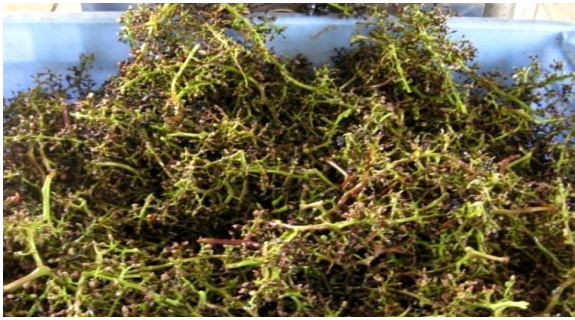
## **2.3 Resultados e discussão**

### **2.3.1 Coleta das amostras dos resíduos agroindustriais**

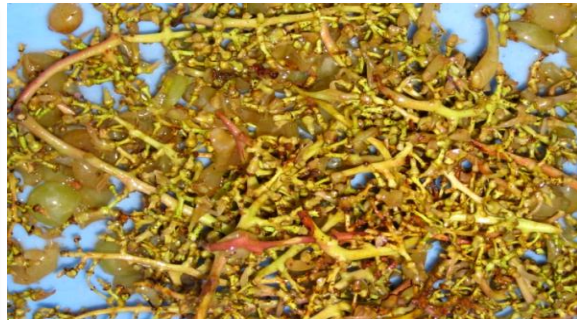
Ao longo do ano de 2009 foram coletadas 15 amostras de resíduos agroindustriais em diferentes épocas. Os materiais coletados foram mantidos congelados durante o transporte dos pontos de coleta até o laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental na ESALQ e, na sequência, armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$  até serem liofilizados. As figuras 15 e 16 ilustram o aspecto dos resíduos *in natura* após a coleta.

A borra de vinho tinto (Figura 16 A) foi centrifugada (10.000 g/15min) e o precipitado (Figura 16 B) liofilizado, moído e analisado na sequência. O bagaço de malte já foi obtido no estado seco, enquanto que a borra branca foi desidratada em estufa de circulação de ar à  $45^{\circ}\text{C}$ , pela impossibilidade de congelamento devido ao alto teor alcoólico presente.





**Engaço de uva tinta**



**Engaço de uva branca**



**Bagaço de malte**



**Bagaço de goiaba**



**Bagaço de Cabernet Sauvignon**



**Bagaço de Pinot Noir**



**Bagaço de Isabel**



**Bagaço de Moscato**



**Borra de vinho branco**

Figura 15 – Aspecto visual dos resíduos agroindustriais *in natura* coletados no primeiro semestre de 2009



Figura 16 – Aspecto visual dos resíduos agroindustriais *in natura* coletados no segundo semestre de 2009

A tabela 4 apresenta o rendimento dos resíduos após o processo de liofilização. De modo geral, todos apresentaram bom rendimento, com destaque para o bagaço de goiaba (38,32%), fato que pode ser explicado pela grande quantidade de sementes em sua composição, seguido pelo bagaço de uva Pinot Noir (36,29%) e engaço tinto (Petrolina) (35,16%). O bagaço de Cabernet Sauvignon foi o que apresentou menor rendimento (21,76%) em comparação com os demais bagaços de uva. Por tratar-se de materiais heterogêneos, esta grande variação de rendimentos pode ser devida, entre outros fatores, ao processo de prensagem que é capaz de eliminar mais ou menos mosto de acordo com o procedimento adotado. Além disso, a quantidade de sementes presente na composição final desses bagaços influencia diretamente o rendimento.

O precipitado de borra tinta rendeu 37,24%, entretanto, ao remeter este dado para a borra tinta bruta, forma em que foi coletada, este valor passa para 11,69%, queda certamente influenciada pelo vinho presente em sua composição, eliminado após a etapa de centrifugação.

Tabela 4 – Rendimento dos resíduos agroindustriais após o processo de liofilização

Resíduos agroindustriais	Pesos		Rendimento (%)
	Pré liofilização (g)	Pós liofilização (g)	
Engaço branco	885,15	234,04	26,44
Bagaço (Pinot Noir)	1653,4	595,51	36,29
Engaço tinto	2673,41	827,84	30,97
Bagaço (C. Sauvignon)	3282,24	714,27	21,76
Bagaço (Isabel)	1297,23	355,67	27,44
Bagaço (Moscato)	2670,28	643,33	24,09
Borra tinta (bruto) <sup>A</sup>	895,53	104,73	11,69
Borra tinta (precipitado) <sup>B</sup>	281,21	104,73	37,24
Bagaço (Petit Verdot)	1132,77	297,8	26,36
Bagaço (Verdejo)	849,5	264,12	31,19
Engaço tinto (Petrolina)	872,86	460,96	35,16
Engaço branco (Petrolina)	2006,54	584,16	29,16
Bagaço goiaba	1745,08	675,57	38,32
Bagaço tomate	1178,69	254,65	21,61

<sup>A</sup> Rendimento em relação à borra tinta bruta (Figura 16 A)

<sup>B</sup> Rendimento do precipitado liofilizado da borra tinta (Figura 16 B)

### 2.3.2 Espectrofotometria na região ultravioleta visível

Os espectros de absorção na região ultravioleta visível dos extratos dos resíduos agroindustriais obtidos com água, etanol 80%, acetato de etila, clorofórmio e hexano estão

ilustrados nas figuras 17, 18 e 19. De acordo com Mabry, Markham e Thomas (1971) apud Oldoni (2007), a faixa de comprimento de onda ( $\lambda$ ) entre 220 e 350 nm corresponde à região do ultra-violeta na qual os compostos fenólicos absorvem luz.

A espectrofotometria na região ultravioleta e visível tem aplicação um tanto limitada em análises qualitativas, porque o número de máximos e mínimos de absorção é relativamente pequeno. Assim, a identificação ambígua frequentemente acontece. Ao escolher um solvente, deve-se considerar não apenas a sua transparência, mas também os seus possíveis efeitos sobre o sistema absorvente (OWEN, 2000). Geralmente solventes polares, como água, álcoois, ésteres e cetonas, tendem a obliterar a estrutura fina espectral que se origina de efeitos vibracionais; espectros que se aproximam aos de fase gasosa tem maior possibilidade de serem observados em solventes não polares como hidrocarbonetos. Portanto, as posições de máximos de absorção são influenciadas pela natureza do solvente. Evidentemente, o mesmo solvente deve ser usado ao se comparar espectros de absorção com propósitos de comparação e identificação, como foi feito neste trabalho.

Mesmo não sendo possível uma identificação não ambígua de um composto orgânico, ainda assim, um espectro de absorção na região ultravioleta e visível é útil para se detectar a presença de certos grupos funcionais que funcionam como cromóforos. Por exemplo, uma banda de absorção fraca na região de 280 nm a 290 nm, que é deslocada para comprimentos de ondas menores com o aumento de polaridade do solvente, indica fortemente a presença do grupo carbonila. Uma banda de absorção ao redor de 260 nm como observado para algumas amostras de resíduos, evidencia a existência de um anel aromático (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1971).

Os diversos espectros de absorção observados entre as amostras e os solventes etanol, água, acetato de etila, clorofórmio e hexano demonstram, sem nenhuma dúvida, a existência de diferentes compostos ou classe de compostos, com fortes indícios da presença de compostos fenólicos em todas as amostras, em intensidades variáveis.

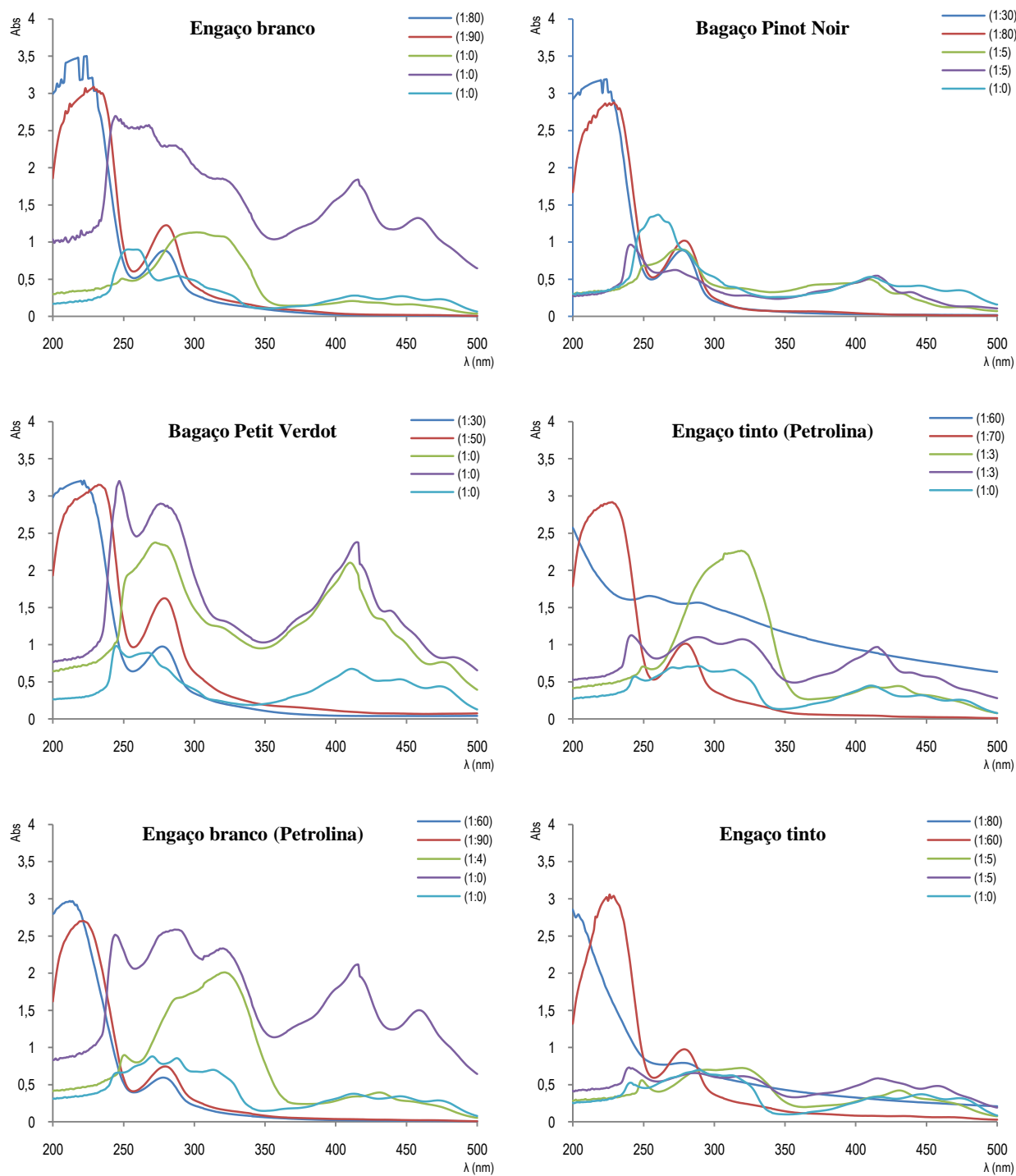


Figura 17 – Espectros de absorção na região UV-visível dos extratos dos resíduos agroindustriais obtidos com diferentes solventes. Os números entre parênteses referem-se as diluições utilizadas para a obtenção dos respectivos espectros (extrato:solvente, v/v)

Legenda: — Água — Etanol 80% — Acetato de Etila — Clorofórmio — Hexano

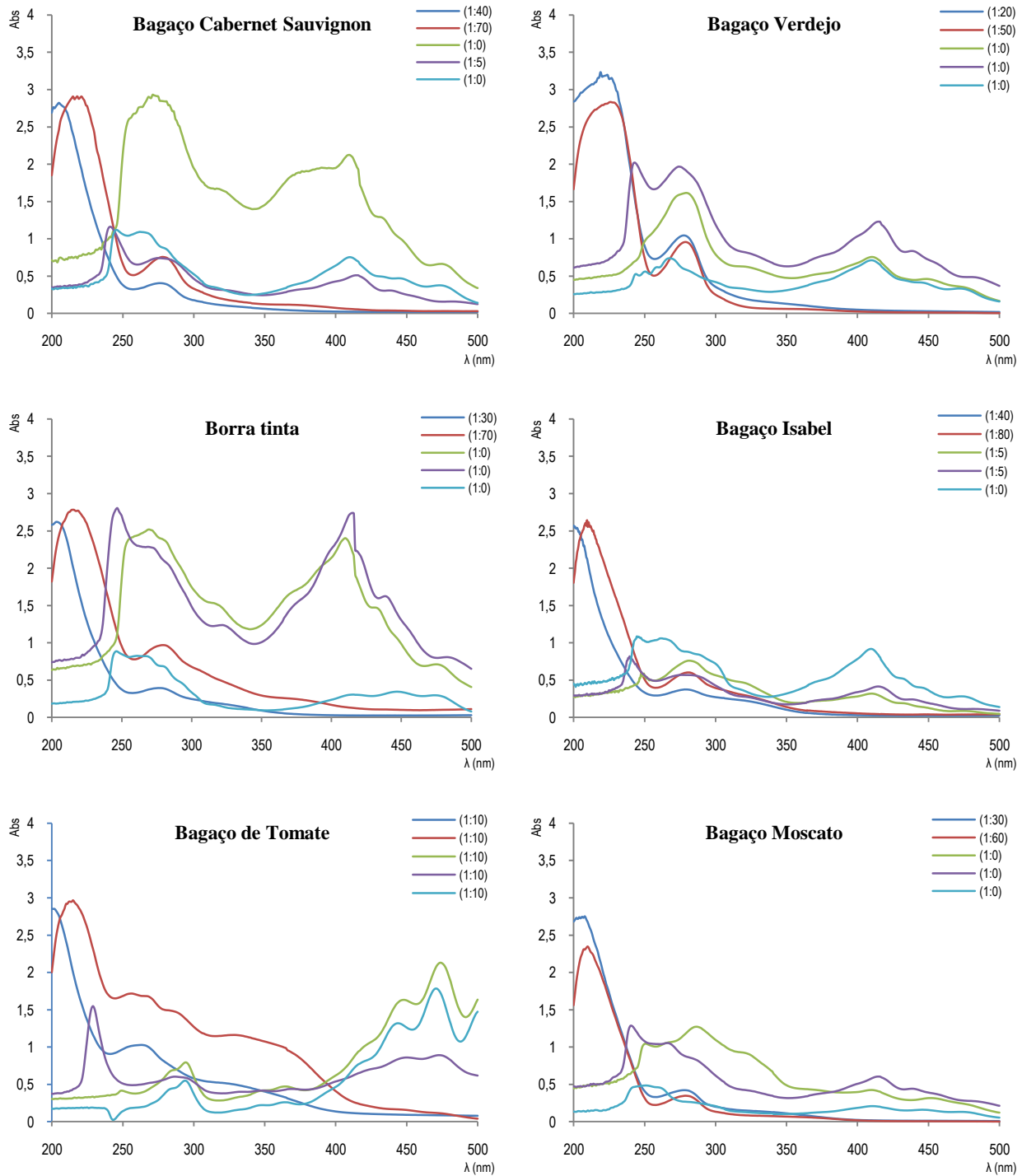


Figura 18 – Espectros de absorção na região UV-visível dos extratos dos resíduos agroindustriais obtidos com diferentes solventes. Os números entre parênteses referem-se as diluições utilizadas para a obtenção dos respectivos espectros (extrato:solvente, v/v)

Legenda: — Água — Etanol 80% — Acetato de Etila — Clorofórmio — Hexano

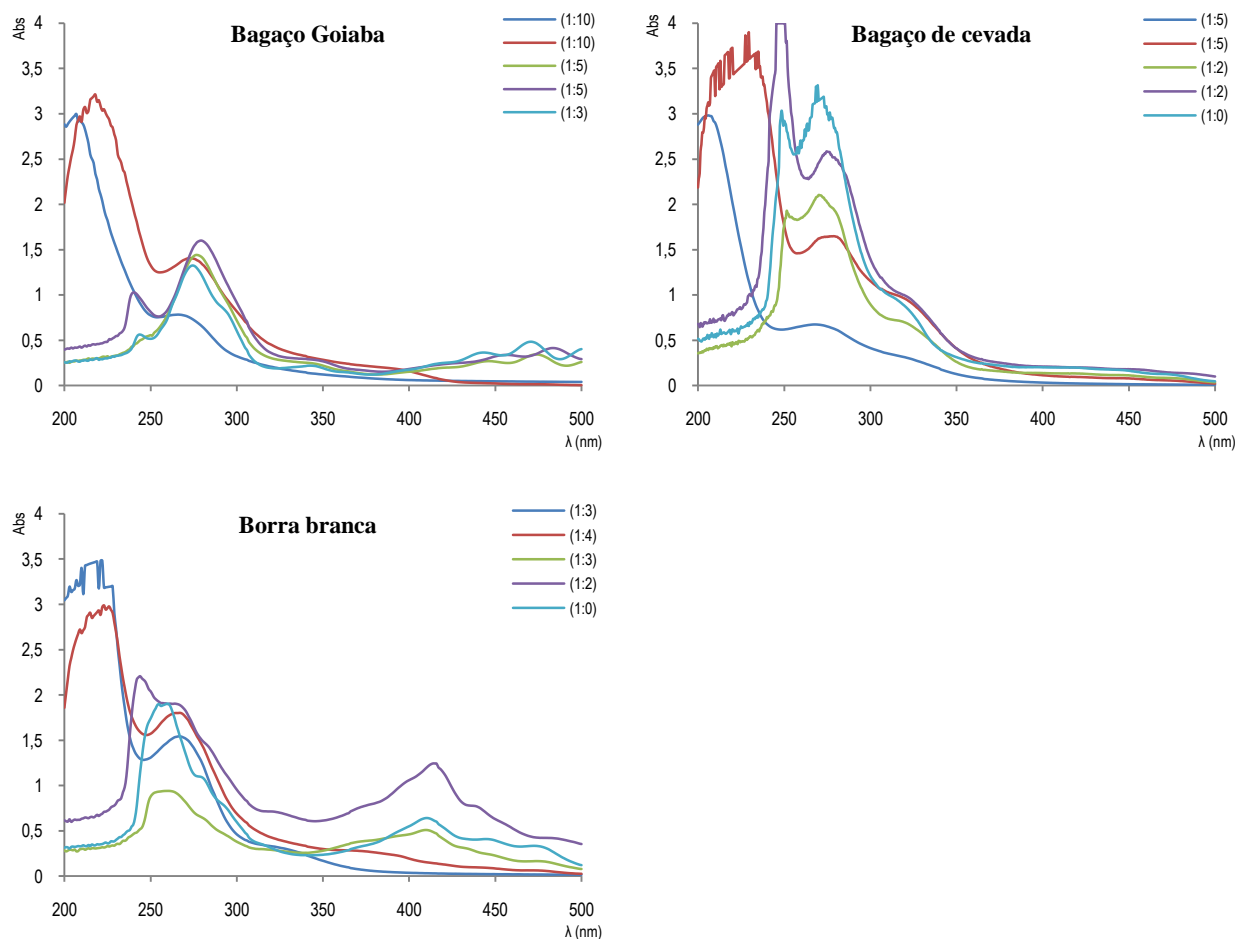


Figura 19 – Espectros de absorção na região UV-visível dos extratos dos resíduos agroindustriais obtidos com diferentes solventes. Os números entre parênteses referem-se as diluições utilizadas para a obtenção dos respectivos espectros (extrato:solvente, v/v)

Legenda: — Água — Etanol 80% — Acetato de Etila — Clorofórmio — Hexano

### 2.3.3 Screening dos resíduos agroindustriais de maior atividade antioxidante

Para a seleção das amostras mais promissoras e dos melhores solventes extratores foram utilizados o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante pelo método do radical livre DPPH. Esta etapa foi incluída com o objetivo de direcionar as análises para os extratos dos materiais mais bioativos.

#### 2.3.3.1 Teor de compostos fenólicos totais

Os resultados dos teores de compostos fenólicos totais dos extratos obtidos com os solventes etanol 80%, água, acetato de etila, clorofórmio e hexano, expressos em mg/g (equivalentes em ácido gálico), estão apresentados na tabela 5. Devido a incompatibilidade de

polaridade entre os solventes acetato de etila, clorofórmio e hexano e os reagentes utilizados na determinação de fenólicos totais, não foi possível quantificar o teor destes compostos nos extratos obtidos por tais solventes.

Tabela 5 – Teor de compostos fenólicos totais (mg/g) nos extratos dos resíduos agroindustriais

Resíduos Agroindustriais	Solventes				
	Etanol 80% <sup>(a,b)</sup>	Água <sup>(a,b)</sup>	Acetato Etila <sup>(c)</sup>	Clorofórmio <sup>(c)</sup>	Hexano <sup>(c)</sup>
1 Engaço branco	48,61±0,57 <sup>a</sup>	33,40±0,75 <sup>c</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
2 Bagaço (Pinot Noir)	40,79±0,51 <sup>b</sup>	13,60±0,42 <sup>sh</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
3 Bagaço (Petit Verdot)	33,14±1,19 <sup>c</sup>	12,11±0,94 <sup>h</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
4 Engaço tinto (Petrolina)	29,55±0,71 <sup>cd</sup>	6,71±0,88 <sup>k</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
5 Engaço branco (Petrolina)	27,66±0,76 <sup>d</sup>	15,89±0,77 <sup>fg</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
6 Engaço tinto	25,45±0,52 <sup>d</sup>	15,37±0,56 <sup>fg</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
7 Bagaço (C. Sauvignon)	21,45±1,96 <sup>e</sup>	6,69±0,13 <sup>k</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
8 Bagaço (Verdejo)	20,94±0,46 <sup>e</sup>	8,03±0,43 <sup>j</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
9 Borra tinta	20,55±0,47 <sup>e</sup>	4,94±0,59 <sup>lm</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
10 Bagaço (Isabel)	16,57±0,19 <sup>f</sup>	4,41±0,01 <sup>m</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
11 Bagaço Tomate	14,60±0,10 <sup>fg</sup>	9,45±0,04 <sup>ij</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
12 Bagaço (Moscato)	9,91±0,38 <sup>i</sup>	5,32±0,31 <sup>l</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
13 Bagaço goiaba	3,41±0,09 <sup>n</sup>	1,88±0,06 <sup>o</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
14 Bagaço de malte	1,35±0,12 <sup>p</sup>	0,56±0,01 <sup>r</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
15 Borra branca	1,28±0,06 <sup>p</sup>	1,01±0,03 <sup>q</sup>	n.d.	n.d.	n.d.

<sup>(a)</sup> Média ± desvio padrão da triplicata da extração. Letras diferentes diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey

<sup>(b)</sup> Equivalentes em ácido gálico

<sup>(c)</sup> Teor de compostos fenólicos totais não determinado (n.d.)

De acordo com os resultados, pode-se observar que o extrato etanólico foi, para todos os resíduos, mais eficaz na extração de compostos fenólicos do que o extrato aquoso. Estudo feito por Lafka, Sinanoglou e Lazos (2007), mostrou que a mistura etanol:água (1:1), dentre os solventes testados, também apresentou os maiores teores de compostos fenólicos para bagaço de uva (28,9 mg/GAE g).

A maior eficiência na extração de compostos fenólicos pelo solvente etanol 80% foi também demonstrada pelos espectros de absorção na região UV-visível, apresentados nas figuras 17, 18 e 19. Na maioria deles, observa-se que as máximas bandas de absorção, no intervalo de 220 a 350 nm, são correspondentes aos extratos etanólicos, levando-se em consideração os fatores de diluição.



Dos extratos dos resíduos analisados, merecem destaque os vinícolas, principalmente o engaço de uva branca e o bagaço (Pinot Noir). A borra branca apresentou o menor teor, talvez pelo método diferenciado de secagem empregado – estufa com circulação de ar à 45 °C, que pode ter contribuído para a degradação de compostos fenólicos termossensíveis. A atividade antioxidante de resíduos vinícolas mostrou-se inversamente proporcional ao aumento de temperatura (LAFKA; SINANOGLU; LAZOS, 2007), demonstrando que compostos fenólicos importantes na expressão da atividade antioxidante podem ter sido degradados.

A grande diferença observada nos grupos de resíduos, bagaços tintos, brancos e engaços brancos, indica que a variedade possui influência na composição fenólica dos mesmos. Makris et al. (2007) analisaram a composição polifenólica de bagaços de uva branca, tinta e engaço e encontraram teores, equivalentes em ácido gálico, de 48,26 mg/g para bagaço de uva branca; 54,02 mg/g para bagaço de uva tinta e 57,98 mg/g no engaço. Essa mesma tendência pode ser observada neste trabalho para algumas amostras (Bagaço Verdejo  $20,94 \pm 0,46$  (variedade branca) < Bagaço Pinot Noir  $40,79 \pm 0,51$  (variedade tinta) < Engaço branco  $48,61 \pm 0,57$ ).

Ao analisar a fruta inteira e o bagaço obtido do processamento vinícola de quatro variedades diferentes de uvas, Thimothe et al. (2007), verificaram que o bagaço apresentou os maiores teores de compostos fenólicos totais, para todas as variedades. Em outro estudo conduzido por Rupasinghe e Clegg (2007), o teor de compostos fenólicos totais encontrados em vinho de Cabernet Sauvignon foi de 2 mg GAE/mL. Os compostos fenólicos da uva estão, portanto, concentrados na casca e semente, os quais compõem a maior parte dos resíduos do setor vinícola, descartados diariamente.

Com relação ao resíduo de tomate, não foi encontrado nenhum trabalho com o bagaço e sua composição fenólica. Contudo, no suco, em estudo que analisou diversos produtos provindos desta matéria-prima, foram encontrados teores que variaram de 4,69 a 8,67 mg/g GAE (PODSEDEK; SOSNOWSKA; ANDERS, 2003). O bagaço, aqui estudado, apresentou cerca de duas vezes mais compostos fenólicos, que são descartados, todos os anos, junto às toneladas de resíduos gerados durante o processamento industrial do tomate.

Apesar do baixo teor de compostos fenólicos totais no bagaço de goiaba ( $3,41 \pm 0,09$ ), este mostrou-se condizente aos teores encontrados por Thaipong et al. (2006) para quatro variedades da fruta, que variaram de 1,7 à 3,4 mg/g GAE, em massa fresca. Torna-se ainda necessário avaliar o potencial dos compostos fenólicos presentes neste bagaço.

Por tratar-se de um método simplesmente quantitativo para uma classe de compostos químicos, os teores de compostos fenólicos totais encontrados neste ensaio não são suficientes para selecionar as melhores amostras e solventes. Os compostos fenólicos totais dos extratos podem apresentar muita heterogeneidade quanto ao seu mecanismo de ação e poder antioxidante, impossibilitando uma seleção baseada somente neste parâmetro.

### 2.3.3.2 Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH

O *screening* da atividade antioxidante dos extratos das amostras foi feito por meio do método de sequestro do radical livre DPPH. O princípio deste método está fundamentado no descoloramento de uma solução de radicais livres estáveis (DPPH<sup>o</sup>) de cor violeta pela transferência de elétrons de um composto antioxidante (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). A tabela 6 mostra os resultados encontrados.

Tabela 6 – Atividade antioxidante expressa em porcentagem pelo método de sequestro do radical livre DPPH

Resíduos Agroindustriais	Solventes				
	Etanol 80% <sup>(a,b)</sup>	Água <sup>(a,b)</sup>	Acetato Etila <sup>(a,b)</sup>	Clorofórmio <sup>(a,b)</sup>	Hexano <sup>(a,b)</sup>
1 Engaço branco	94,22±0,52 <sup>bcde</sup>	90,92±0,20 <sup>lg</sup>	17,46±2,98	12,57±3,29	4,24±1,13
2 Bagaço (Pinot Noir)	95,53±0,16 <sup>abcd</sup>	94,68±0,17 <sup>bcd</sup>	38,27±2,72	4,39±0,86	2,09±0,16
3 Bagaço (Petit Verdot)	96,72±0,31 <sup>ab</sup>	95,35±0,12 <sup>bcd</sup>	11,21±0,68	5,92±0,63	1,90±0,80
4 Engaço tinto (Petrolina)	95,36±0,11 <sup>bcd</sup>	84,84±1,10 <sup>h</sup>	10,77±0,48	10,76±6,41	-0,12±0,66
5 Engaço branco (Petrolina)	94,36±0,15 <sup>bcde</sup>	92,89±0,71 <sup>def</sup>	13,77±1,08	7,03±1,61	1,39±0,43
6 Engaço tinto	91,57±0,57 <sup>ef</sup>	82,82±0,79 <sup>h</sup>	10,01±1,31	9,22±2,37	-2,00±0,33
7 Bagaço (C. Sauvignon)	96,45±0,13 <sup>abc</sup>	94,78±0,08 <sup>bcd</sup>	11,54±0,66	8,67±0,98	2,50±0,11
8 Bagaço (Verdejo)	93,45±0,29 <sup>cdef</sup>	93,40±0,33 <sup>cdef</sup>	15,59±0,60	6,92±1,40	3,19±0,94
9 Borra tinta <sup>(c)</sup>	98,49±0,18 <sup>a</sup>	92,78±3,56 <sup>def</sup>	13,84±1,82	6,23±0,25	2,44±0,63
10 Bagaço (Isabel)	97,20±0,13 <sup>ab</sup>	71,88±0,73 <sup>i</sup>	30,39±1,28	10,96±0,62	5,94±0,49
11 Bagaço Tomate	66,81±1,6 <sup>lj</sup>	67,88±1,06 <sup>j</sup>	28,86±0,94	19,93±4,66	15,97±1,12
12 Bagaço (Moscato)	94,91±0,06 <sup>bcd</sup>	93,38±0,04 <sup>def</sup>	5,59±0,27	4,94±0,33	0,49±0,34
13 Bagaço goiaba	88,07±0,72 <sup>g</sup>	59,35±1,75 <sup>k</sup>	6,25±0,99	4,47±1,66	1,33±0,86
14 Bagaço de malte	9,54±0,86 <sup>n</sup>	5,28±0,41 <sup>o</sup>	2,47±0,31	3,45±1,24	1,65±0,52
15 Borra branca	25,65±1,45 <sup>l</sup>	18,78±0,49 <sup>m</sup>	6,44±1,47	3,59±0,24	4,26±0,63
Alfa-tocoferol (100 ppm)	94,74±0,11	-	-	-	-
BHT (100 ppm)	18,92±1,40	-	-	-	-

<sup>(a)</sup> Média ± desvio padrão da triplicata da extração. Letras diferentes diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey

<sup>(b)</sup> Extratos diluídos na proporção 1:10

<sup>(c)</sup> Extrato etanólico diluído na proporção 1:20

É possível observar que os extratos etanólico e aquoso apresentaram as maiores porcentagens de atividade antioxidante. A atividade antioxidante foi diretamente proporcional a diminuição da polaridade dos solventes (hexano < clorofórmio < acetato de etila < água < etanol 80%), como pode ser melhor visualizado na figura 20. Esse comportamento pode ser explicado pelo perfil majoritariamente polar dos compostos fenólicos, os quais são essenciais na expressão da atividade antioxidante destes materiais.

Com exceção dos extratos de bagaço de malte, tomate e de borra branca, os demais extratos etanólicos apresentaram atividade antioxidante superior a 80%, diluídos na proporção de 1:10 (extrato:solvente, v/v). Entre os extratos aquosos, destacaram-se os de bagaço de Petit Verdot, Pinot Noir, Cabernet Sauvignon, Moscato, Verdejo, borra tinta e engaços de uva branca, com percentuais superiores a 90% de atividade antioxidante.

Existem muitas disparidades entre dados de atividade antioxidante de resíduos vinícolas na literatura, em função, principalmente, da diferença entre as variedades de uva, origem geográfica e métodos de extração empregados, o que dificulta estabelecer comparações. Contudo, a elevada atividade antioxidante de bagaço de uva, engaço e sementes já foi relatada por vários autores (LLOBERA; CAÑELLAS, 2007; RUBERTO et al., 2007; MAKRIS; BOSKOU; ANDRIKOPOULOS, 2007; LAFKA et al., 2007).

Com relação a goiaba, raros são os estudos acerca das propriedades bioativas de resíduos do seu processamento, entretanto, uma correlação significativa entre o conteúdo fenólico da fruta e a atividade de sequestro de radicais livres foi relatada por Jiménez-Escrig et al. (2001). Isso pode ser claramente notado neste estudo quando se compara seu baixo teor de fenólicos totais (3,41 mg/grama no extrato etanólico) com a boa atividade antioxidante apresentada no ensaio de sequestro do radical livre DPPH (88,07%).

Além do bagaço de goiaba, os extratos das uvas Isabel e Moscato e da borra tinta também apresentaram baixos teores de compostos fenólicos totais em relação aos outros resíduos (tabela 5), entretanto, equipararam-se a eles quanto a atividade antioxidante. Em contrapartida, o bagaço de tomate, com teor de compostos fenólicos cerca de quatro vezes maior do que o de goiaba, apresentou atividade antioxidante inferior (66,81%). Isso sugere a existência de compostos fenólicos com poder antioxidante distinto na composição destes resíduos, o que reforça a necessidade da identificação do perfil fenólico desses extratos.

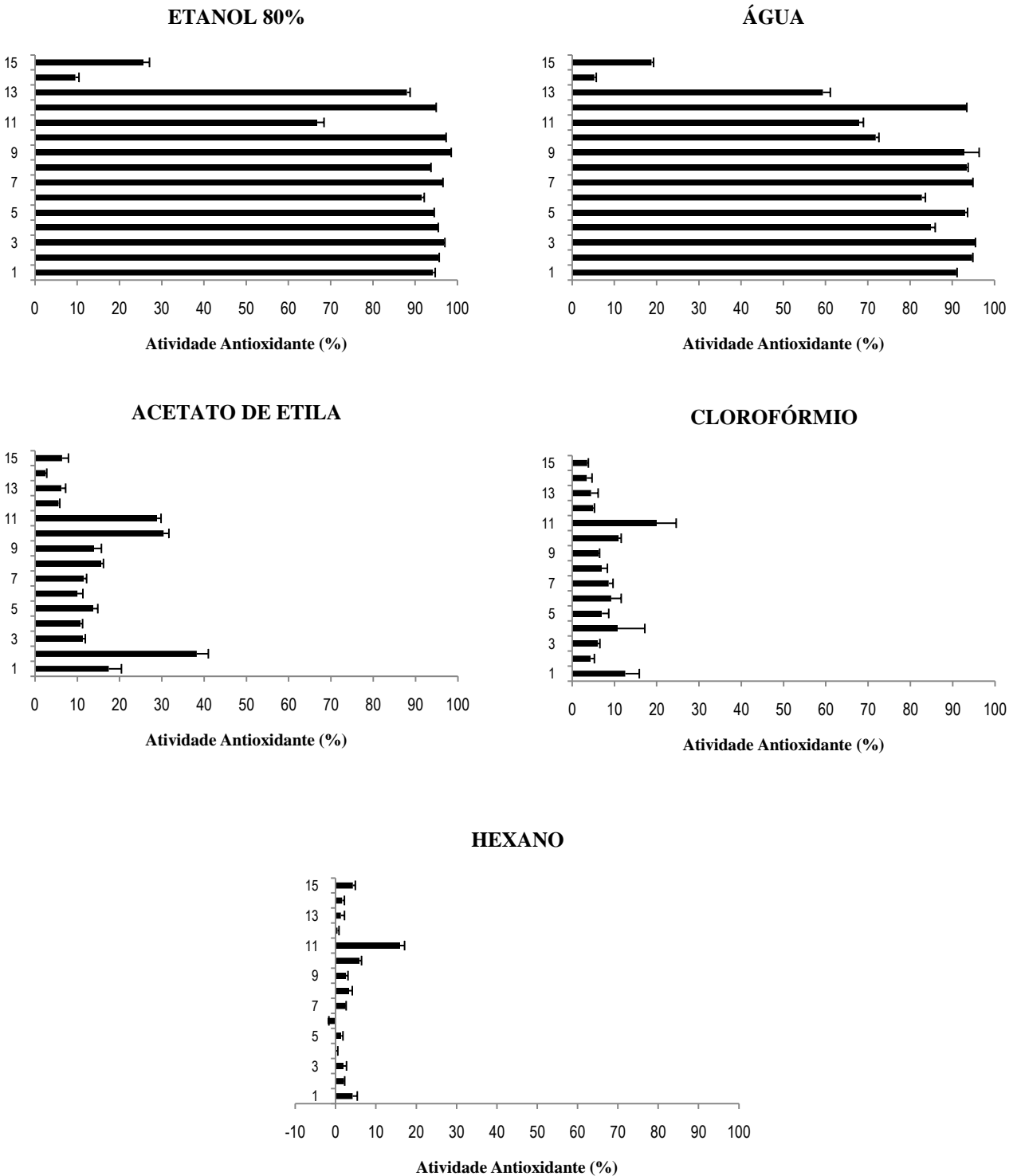


Figura 20 – Atividade antioxidante dos resíduos, extraídos com cinco solventes de diferentes polaridades, pelo método de redução do radical livre DPPH. Legenda: 1=Engaço branco; 2=Bagaço (Pinot Noir); 3=Bagaço (Petit Verdot); 4=Engaço tinto (Petrolina); 5=Engaço branco (Petrolina); 6=Engaço tinto; 7=Bagaço (Cabernet Sauvignon); 8=Bagaço (Verdejo); 9=Borra tinta; 10=Bagaço (Isabel); 11=Bagaço tomate; 12=Bagaço (Moscato); 13=Bagaço goiaba; 14=Bagaço malte; 15=Borra branca

De acordo com os resultados obtidos pelos ensaios de *screening*, foram escolhidos etanol 80% e água como melhores solventes na extração de compostos antioxidantes e as amostras engaços de uva branca e tinta, borra tinta e bagaços de Pinot Noir, Cabernet Sauvignon, Isabel, Petit Verdot, Verdejo, Moscato, goiaba e tomate como as mais promissoras bioativamente. Portanto, somente os extratos etanólico e aquoso dos resíduos selecionados seguiram para os próximos ensaios biológicos e químicos.

### **2.3.4 Determinação da atividade antioxidante**

#### **2.3.4.1 EC<sub>50</sub>**

Este ensaio permite conhecer a quantidade mínima de amostra capaz de reduzir em 50% o radical livre DPPH, bem como a cinética da reação. Sua execução é recomendável uma vez que a análise de atividade antioxidante pela redução do radical DPPH, expressa em porcentagem, pode subestimar o potencial real das amostras, pois os compostos antioxidantes podem apresentar diferentes cinéticas de reação.

Os valores de EC<sub>50</sub> dos extratos etanólico e aquoso dos resíduos agroindustriais estão apresentados na tabela 7. Os extratos etanólicos mostraram os melhores resultados para todos os resíduos, com destaque para os engaços brancos, engaço tinto (Petrolina) e bagaço (Pinot Noir). Já entre os aquosos, o engaço branco e o bagaço (Pinot Noir) destacaram-se.

Tabela 7 – Valores de EC<sub>50</sub> (mg/mL) dos extratos etanólico e aquoso dos resíduos agroindustriais

Resíduos Agroindustriais	EC <sub>50</sub> (mg/mL)	
	Etanol 80%	Água
1 Engaço branco	0,20	0,32
2 Bagaço (Pinot Noir)	0,32	0,50
3 Bagaço (Petit Verdot)	0,60	0,88
4 Engaço tinto (Petrolina)	0,32	0,72
5 Engaço branco (Petrolina)	0,31	0,64
6 Engaço tinto	0,56	0,60
7 Bagaço (C. Sauvignon)	0,40	1,61
8 Bagaço (Verdejo)	0,55	2,00
9 Borra tinta	0,56	3,16
10 Bagaço (Isabel)	0,78	5,02
11 Bagaço Tomate	10,43	16,83
12 Bagaço (Moscato)	1,13	2,00
13 Bagaço goiaba	4,35	7,84

Assim como no método de sequestro do radical DPPH, o indicativo de que os compostos fenólicos do bagaço de tomate, embora em maior quantidade em relação ao bagaço de goiaba, possuem menor atividade antioxidante, foi novamente verificado no ensaio EC<sub>50</sub>. Também em concordância com o método anterior, fica nítida a maior eficácia do etanol 80% como solvente de extração de compostos antioxidantes em relação aos outros solventes testados.

Além disso, é possível observar diferenças no poder antioxidante dos diferentes grupos – bagaços tintos, brancos e engaços tintos e brancos – o que reforça a tendência já observada na análise do teor de compostos fenólicos totais, de que a variedade, além de outros fatores, possui influência direta na expressão da atividade antioxidante.

Estudo feito por Ruberto et al. (2007) avaliou bagaços de cinco variedades de uvas e encontraram valores de EC<sub>50</sub> que variaram de 0,014 a 0,038 mg/mL. A discrepância em relação aos valores dos bagaços analisados nesse trabalho (0,32 a 5,02 mg/mL) pode ser devida ao método de extração empregado, às variedades analisadas, às condições geográficas em que foram produzidas as uvas, às particularidades do processo produtivo, entre outros.

O extrato de bagaço de Cabernet Sauvignon apresentou um valor de EC<sub>50</sub> de 0,2 mg/mL em estudo feito por Rubilar et al. (2007), confirmando o elevado potencial antioxidante desta amostra.

Engaço de uva da variedade Manto Negro apresentou atividade antioxidante cerca de três vezes maior quando comparado ao bagaço de acordo com o estudo feito por Llobera e Cañellas (2007). Essa tendência corrobora com os resultados encontrados para os engaços brancos deste trabalho (tabela 7). Uma primeira interpretação viável seria a presença de compostos de maior poder antioxidante nessas amostras em relação aos bagaços.

### 2.3.4.2 Atividade antioxidante pelo método de redução do radical ABTS

Este método de determinação da atividade antioxidante possui como princípio a descoloração do radical ABTS em função da sua redução por um antioxidante. Essa reação é monitorada espectrofotometricamente e depende, principalmente, da concentração, do poder da substância antioxidante e do tempo de reação. O método pode ser aplicado tanto para estudos de antioxidantes lipofílicos quanto hidrofílicos e ainda para compostos puros e extratos de alimentos (RE et al., 1999).

A tabela 8 apresenta os valores de atividade antioxidante equivalentes ao trolox, referentes aos extratos etanólico e aquoso dos resíduos agroindustriais.

Tabela 8 – Atividade antioxidante equivalente ao trolox pelo método ABTS

Resíduos Agroindustriais	Solventes	
	Etanol 80% <sup>(a,b)</sup> ( $\mu\text{M}$ Trolox/g resíduo)	Água <sup>(a,b)</sup> ( $\mu\text{M}$ Trolox/g resíduo)
1 Engaço branco	384,55 $\pm$ 17,41 <sup>b</sup>	285,65 $\pm$ 15,97 <sup>cd</sup>
2 Bagaço (Pinot Noir)	511,97 $\pm$ 8,18 <sup>a</sup>	118,81 $\pm$ 17,94 <sup>jk</sup>
3 Bagaço (Petit Verdot)	335,11 $\pm$ 13,00 <sup>bc</sup>	122,67 $\pm$ 19,40 <sup>jk</sup>
4 Engaço tinto (Petrolina)	194,19 $\pm$ 12,08 <sup>gh</sup>	35,18 $\pm$ 1,36 <sup>m</sup>
5 Engaço branco (Petrolina)	266,08 $\pm$ 6,71 <sup>de</sup>	185,52 $\pm$ 17,19 <sup>ghi</sup>
6 Engaço tinto	231,26 $\pm$ 12,65 <sup>ef</sup>	167,62 $\pm$ 2,57 <sup>hi</sup>
7 Bagaço (C. Sauvignon)	238,16 $\pm$ 5,74 <sup>efg</sup>	71,41 $\pm$ 3,94 <sup>l</sup>
8 Bagaço (Verdejo)	215,28 $\pm$ 12,81 <sup>fg</sup>	73,99 $\pm$ 4,49 <sup>l</sup>
9 Borra tinta	151,89 $\pm$ 7,41 <sup>ij</sup>	32,10 $\pm$ 0,12 <sup>m</sup>
10 Bagaço (Isabel)	114,60 $\pm$ 15,75 <sup>k</sup>	26,14 $\pm$ 7,09 <sup>mm</sup>
11 Bagaço Tomate	14,42 $\pm$ 0,06 <sup>n</sup>	14,08 $\pm$ 0,07 <sup>n</sup>
12 Bagaço (Moscato)	69,43 $\pm$ 4,58 <sup>l</sup>	32,01 $\pm$ 1,56 <sup>m</sup>
13 Bagaço goiaba	15,15 $\pm$ 6,98 <sup>n</sup>	16,28 $\pm$ 0,66 <sup>n</sup>

<sup>(a)</sup> Média  $\pm$  desvio padrão da triplicata da extração expresso em base seca. Letras diferentes diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey

<sup>(b)</sup> Equivalentes em Trolox

Em concordância com o método de redução do radical livre DPPH, no método ABTS o extrato etanólico foi mais eficaz na extração de compostos antioxidantes. Dentre os resíduos analisados merece destaque o extrato etanólico de bagaço de Pinot Noir seguido pelo engaço de uva branca, bagaço de Petit Verdot, engaço de uva tinta, bagaço de Cabernet Sauvignon, borra tinta, bagaço de Isabel e Moscato. O resíduo de tomate apresentou a menor atividade antioxidante em ambos os extratos. Entre os aquosos, as maiores atividades foram verificadas nos extratos de engaço de uva branca e tinta, respectivamente, seguidos pelos de bagaço de Petit Verdot, Pinot Noir, Cabernet Sauvignon, Moscato e Isabel.

Extratos etanólicos (etanol:água; 70:30; v/v) de bagaço de uvas das variedades Ancelota e Tannat apresentaram valores que concordam com os encontrados para os bagaços tintos deste trabalho:  $389,9 \pm 3,8$  e  $398,1 \pm 2,8$   $\mu\text{M}$  equivalentes em Trolox/g, respectivamente (ROCKENBACH et al., 2008). Valores elevados de atividade antioxidante por este método para bagaços de uva também foram encontrados por Ruberto et al. (2007).

Ao considerar este ensaio, que é mais abrangente que o DPPH quanto à polaridade de antioxidantes, observa-se um novo comportamento dos bagaços de Pinot Noir e Petit Verdot em relação aos engaços. Isso pode ser devido a contribuição de substâncias antioxidantes lipofílicas, presentes nesses bagaços, que agora tiveram suas atividades expressadas.

#### **2.3.4.3 Atividade antioxidante pelo método da auto-oxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoléico**

A tabela 9 apresenta os percentuais de atividade antioxidante pelo método da auto-oxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoléico. Este método avalia o poder de inibição que um antioxidante exerce sobre os radicais formados durante a peroxidação do ácido linoléico. Isto é feito por meio de medidas espectrofotométricas que medem a descoloração do beta-caroteno, induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).



Tabela 9 – Atividade antioxidante expressa em porcentagem pelo método da auto-oxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoléico

Resíduos Agroindustriais	Solventes	
	Etanol 80% <sup>(a,b)</sup>	Água <sup>(a,b)</sup>
1 Engaço branco	31,99±2,98 <sup>ijk</sup>	20,29±0,63 <sup>kl</sup>
2 Bagaço (Pinot Noir)	67,93±1,33 <sup>abc</sup>	59,98±0,87 <sup>def</sup>
3 Bagaço (Petit Verdot)	69,69±3,48 <sup>ab</sup>	67,41±2,07 <sup>abcd</sup>
4 Engaço tinto (Petrolina)	59,20±1,64 <sup>ef</sup>	43,23±0,34 <sup>hi</sup>
5 Engaço branco (Petrolina)	64,87±2,60 <sup>bcde</sup>	45,43±3,39 <sup>h</sup>
6 Engaço tinto	72,13±1,68 <sup>a</sup>	59,57±0,61 <sup>ef</sup>
7 Bagaço (C. Sauvignon)	59,58±0,39 <sup>ef</sup>	44,02±2,34 <sup>hi</sup>
8 Bagaço (Verdejo)	56,73±3,62 <sup>fg</sup>	57,70±2,54 <sup>efg</sup>
9 Borra tinta	27,53±8,86 <sup>ijkl</sup>	37,68±7,37 <sup>hij</sup>
10 Bagaço (Isabel)	61,99±2,18 <sup>cdef</sup>	48,49±4,61 <sup>gh</sup>
11 Bagaço Tomate	45,60±4,52 <sup>h</sup>	29,47±5,89 <sup>ijkl</sup>
12 Bagaço (Moscato)	36,81±7,10 <sup>hij</sup>	38,76±6,11 <sup>hij</sup>
13 Bagaço de goiaba	7,06±0,58 <sup>l</sup>	19,72±3,78 <sup>kl</sup>
<b>Padrões</b>	<b>Etanol 100%</b>	
24 Alfa-tocoferol (100 ppm)	91,79±0,35	-
25 BHT (100 ppm)	88,98±2,16	-

<sup>(a)</sup> Média ± desvio padrão da triplicata da extração. Letras diferentes diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey

<sup>(b)</sup> Extratos diluídos na proporção 1:10

Os padrões utilizados como referência, alfa-tocoferol e BHT, apresentaram as maiores atividades antioxidantes, 91,79 e 88,98%, respectivamente. Os extratos etanólicos foram mais eficazes na ação antioxidante, exceto para os bagaços de Moscato, Verdejo, goiaba e borra tinta que apresentaram maior atividade no extrato aquoso, como pode ser melhor observado na figura 21. O extrato etanólico de engaço de uva tinta e o extrato aquoso de bagaço de Pinot Noir apresentaram, dentre estes solventes, os maiores percentuais de atividade antioxidante, 72,13 e 59,98%, respectivamente. Os menores valores foram observados para os extratos de bagaço de goiaba.

Ao comparar esta metodologia com a de avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical livre DPPH, verifica-se que os extratos dos resíduos comportaram-se de forma diferente. Isso pode ser devido às particularidades do método, composto por uma emulsão,

apresentando simultaneamente, regiões polares e apolares. O engaço branco, por exemplo, apresentou baixa capacidade antioxidante em uma matriz lipídica, neste caso, uma emulsão óleo em água. Entretanto, quando submetido aos meios compostos por solventes orgânicos, como nas análises anteriores (Tabelas 6, 7 e 8), mostrou-se muito eficaz no sequestro de radicais livres. Considerando o comportamento de antioxidantes em meios lipídicos é conveniente supor que este resíduo, em particular, contém, no contexto de seus compostos bioativos, moléculas antioxidantes polares em maior quantidade do que os outros resíduos que apresentaram alta atividade por este método.

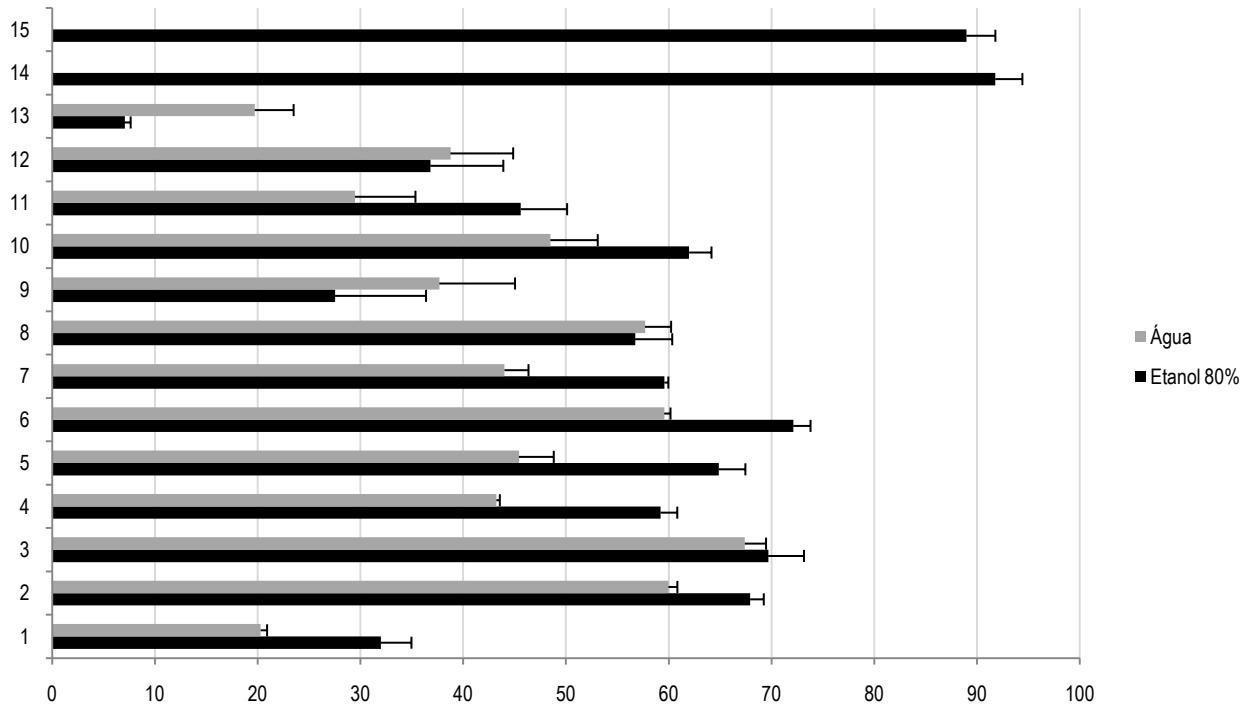


Figura 21 – Porcentagem de atividade antioxidante dos extratos etanólico e aquoso dos resíduos agroindustriais pelo método da auto-oxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoléico  
 Legenda: 1 = Engaço branco; 2 = Bagaço (Pinot Noir); 3= Bagaço (Petit Verdot); 4 = Engaço tinto (Petrolina); 5 = Engaço branco (Petrolina); 6 = Engaço tinto; 7 = Bagaço (C. Sauvignon); 8 = Bagaço (Verdejo); 9 = Borra tinta; 10 = Bagaço (Isabel); 11 = Bagaço Tomate; 12 = Bagaço (Moscato); 13 = Bagaço goiaba; 14 = alfa-tocoferol 100 ppm; 15 = BHT 100 ppm

A cinética do descolorimento do beta-caroteno durante os 120 minutos de análise, apresentada nas figuras 22 e 23, mostra o comportamento semelhante de ambos os extratos, etanólico e aquoso. Com base nas figuras, verifica-se que o extrato etanólico do engaço branco

(Petrolina) e o aquoso do bagaço (Verdejo) apresentaram melhor desempenho, estando mais próximos dos padrões testados alfa-tocoferol e BHT, embora não tenham apresentado os maiores percentuais de atividade antioxidante (Tabela 9).

O mecanismo de descoloramento do beta-caroteno é um fenômeno mediado por radicais livres formados durante a oxidação do ácido linoléico. O radical livre ácido linoléico formado após a abstração de um átomo de hidrogênio de um dos seus grupos metilênicos dialílicos ataca fortemente as moléculas insaturadas de beta-caroteno que sofre rápido descolorimento na ausência de um antioxidante. Como suas duplas ligações são perdidas devido à oxidação, o composto perde sua característica cromófora de cor alaranjada, evento que pode ser monitorado espectrofotometricamente (JAYAPRAKASHA; SINGH; SAKARIAH, 2001). A presença dos extratos na emulsão protege o beta-caroteno da oxidação pela neutralização do radical livre linoleato e outros radicais livres formados no sistema retardando, assim, seu descolorimento.

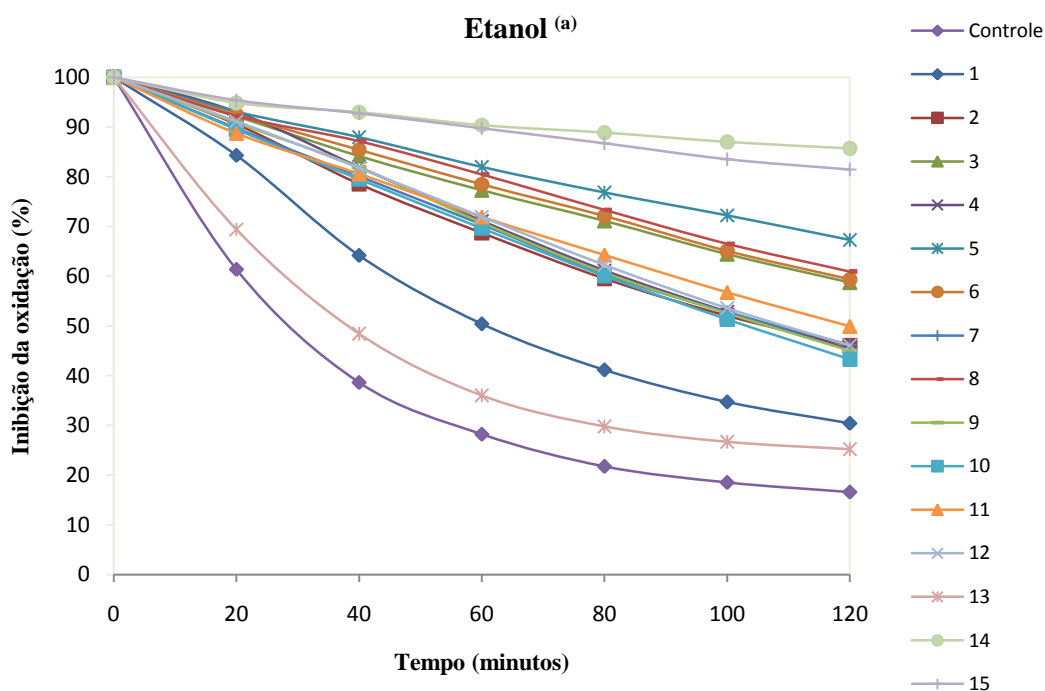


Figura 22 – Cinética de inibição da oxidação dos extratos etanólicos dos resíduos agroindustriais pelo método da auto-oxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoléico  
 Legenda: 1 = Engaço branco; 2 = Bagaço (Pinot Noir); 3 = Bagaço (Petit Verdot); 4 = Engaço tinto (Petrolina); 5 = Engaço branco (Petrolina); 6 = Engaço tinto; 7 = Bagaço (C. Sauvignon); 8 = Bagaço (Verdejo); 9 = Borra tinta; 10 = Bagaço (Isabel); 11 = Bagaço Tomate; 12 = Bagaço (Moscato); 13 = Bagaço goiaba; 14 = alfa-tocoferol 100 ppm; 15 = BHT 100 ppm. <sup>(a)</sup> Extratos etanólicos diluídos na proporção 1:10

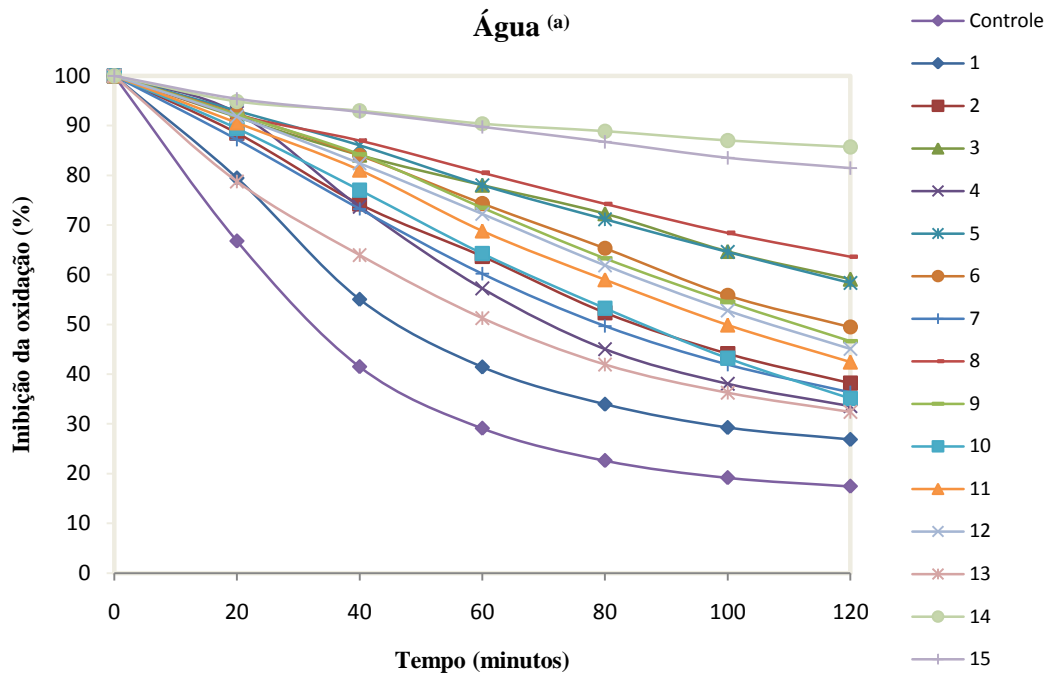


Figura 23 – Cinética de inibição da oxidação dos extratos aquosos dos resíduos agroindustriais pelo método da auto-oxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoléico  
 Legenda: 1 = Engaço branco; 2 = Bagaço (Pinot Noir); 3 = Bagaço (Petit Verdot); 4 = Engaço tinto (Petrolina); 5 = Engaço branco (Petrolina); 6 = Engaço tinto; 7 = Bagaço (C. Sauvignon); 8 = Bagaço (Verdejo); 9 = Borra tinta; 10 = Bagaço (Isabel); 11 = Bagaço Tomate; 12 = Bagaço (Moscato); 13 = Bagaço goiaba; 14 = alfa-tocoferol 100 ppm; 15 = BHT 100 ppm. <sup>(a)</sup> Extratos aquosos diluídos na proporção 1:10

#### 2.3.4.4 Rancimat

O Rancimat é um teste de oxidação acelerada que avalia a estabilidade de óleos e gorduras. Mede-se o tempo transcorrido até o período de indução, caracterizado pela mudança da condutividade elétrica da água deionizada devido a presença de produtos da oxidação.

O período necessário para ocorrência da oxidação do óleo de soja, sem a adição de fontes antioxidantes (controle), foi de 6,84 h, conforme demonstrado na tabela 10.

O tempo transcorrido até a formação de radicais livres, que desencadeiam o processo de oxidação, foi maior no óleo de soja em que foram adicionados os extratos dos bagaços de Pinot Noir e Cabernet Sauvignon e engaço branco (Petrolina), com valores de 7,42, 7,61 e 7,21 horas, respectivamente, assemelhando-se ao antioxidante sintético BHT, utilizado como padrão (7,58 horas). Estes resultados mostram que os extratos atrasaram o início da fase de propagação e consequentemente, a fase de terminação da oxidação. Exerceram, portanto, boa proteção

oxidativa do óleo e isto pode ser devido às características anfifílicas de compostos fenólicos (LAFKA; SINANOGLU; LAZOS, 2007). Todos os extratos foram adicionados ao óleo de soja a uma concentração de 100 ppm (equivalentes em compostos fenólicos). Os extratos aquosos não foram submetidos a esta análise por impossibilidade de sua homogeneização ao óleo, havendo resultados, portanto, somente para os extratos etanólicos.

Tabela 10 – Período de indução das amostras analisadas no Rancimat (controle, óleo adicionado de BHT e extrato de resíduos agroindustriais)

Resíduos agroindustriais <sup>(a)</sup>	Período de Indução <sup>(b)</sup>	Período de Indução <sup>(c)</sup>
Engaço branco	6,16±0,040	6h09m
Bagaço (Pinot Noir)	7,42±0,095	7h25m
Bagaço (Petit Verdot)	7,01±0,141	7h00m
Engaço tinto (Petrolina)	5,72±0,035	5h43m
Engaço branco (Petrolina)	7,21±0,061	7h12m
Engaço tinto	7,01±0,006	7h00m
Bagaço (C. Sauvignon)	7,61±0,067	7h36m
Bagaço (Verdejo)	6,89±0,090	6h53m
Borra tinta	6,37±0,140	6h22m
Bagaço (Isabel)	7,00±0,258	7h00m
Bagaço Tomate	7,01±0,177	7h00m
Bagaço (Moscato)	6,53±3,120	6h31m
Bagaço goiaba	6,27±0,015	6h16m
Controle	6,84±0,384	6h50m
BHT	7,58±0,090	7h34m

<sup>(a)</sup> Óleo de soja adicionado de BHT e dos extratos de resíduos agroindustriais na concentração 100 ppm, exceto o controle, livre de antioxidantes

<sup>(b)</sup> Médias das triplicatas ± desvio padrão

<sup>(c)</sup> Período de Indução convertido em horas (h) e minutos (m)

O bagaço de uva tinta da variedade Agiorgitiko foi testada quanto sua capacidade de prevenir a oxidação de óleo de girassol em estudo desenvolvido por Lafka et al. (2007). Seu extrato etanólico foi adicionado ao óleo à concentração de 150 ppm e, ascorbil palmitato, BHT e vitamina E à 200 ppm. O período de indução do óleo sem antioxidantes foi de 7,45 horas, enquanto que o adicionado do extrato do bagaço estendeu esse tempo para 15,27 h, ficando a frente de todos os outros antioxidantes testados (9,97 h – ascorbil palmitato; 10,23 h – BHT; 9,20 h – vitamina E). Isso demonstra, como também pôde ser observado para algumas amostras estudadas neste trabalho, que resíduos agroindustriais, especialmente os vinícolas, apresentam

elevada atividade antioxidante. Esta atividade observada em matriz lipídica, superou até mesmo o potencial de antioxidantes sintéticos utilizados pela indústria de alimentos.

O fator de proteção de cada uma das amostras está apresentado na figura 24.

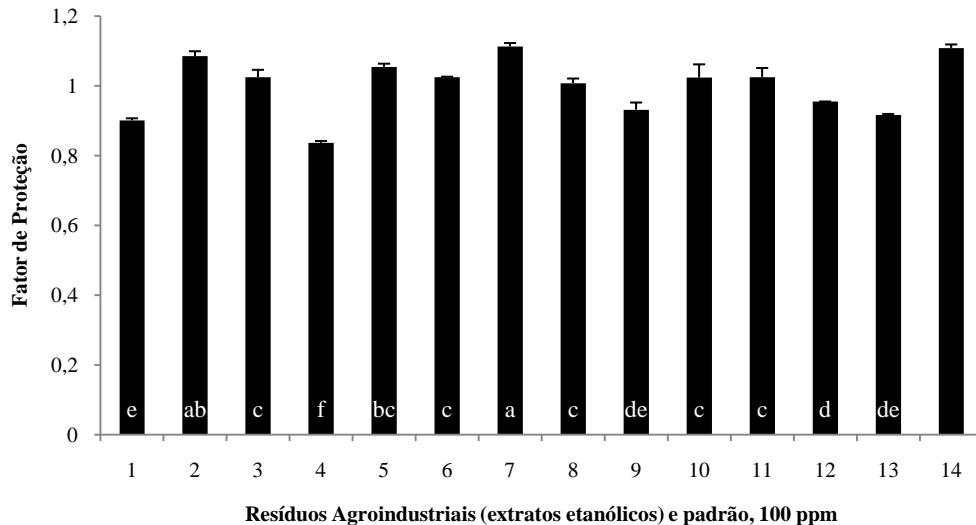


Figura 24 – Fator de proteção obtido a partir da análise de estabilidade oxidativa (Rancimat) do óleo de soja adicionado dos extratos dos resíduos agroindustriais e padrão. Letras diferentes diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey

Legenda: 1 = Engaço branco; 2 = Bagaço (Pinot Noir); 3 = Bagaço (Petit Verdot); 4 = Engaço tinto (Petrolina); 5 = Engaço branco (Petrolina); 6 = Engaço tinto; 7 = Bagaço (C. Sauvignon); 8 = Bagaço (Verdejo); 9 = Borra tinta; 10 = Bagaço (Isabel); 11 = Bagaço Tomate; 12 = Bagaço (Moscato); 13 = Bagaço goiaba; 14 = BHT 100 ppm

O bagaço de tomate, embora apresente baixo teor de compostos fenólicos totais e fraca atividade antioxidante em meios de maior polaridade, apresentou boa atividade em matriz lipídica, desempenho que pode ser verificado tanto na análise Rancimat quanto na auto-oxidação do beta-caroteno. Sua ação superou a demonstrada por muitas amostras de elevado conteúdo fenólico e potencial antioxidante nos ensaios de DPPH e ABTS, tais como engaço branco e tinto (Petrolina), bagaços Verdejo, Moscato, goiaba e borra tinta. O maior pronunciamento da atividade antioxidante do tomate em meios lipídicos pode ter ocorrido devido a contribuição de outros compostos antioxidantes presentes no bagaço de tomate de natureza não fenólica e apolar, como o licopeno.

Em estudo de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos, Malecka (2002) adicionou frações insaponificáveis extraídas de óleo de semente de tomate em óleo de colza a uma

concentração de 0,3%. Após 12 dias à 60°C em ambiente escuro, os valores de peróxidos encontrados no óleo que recebeu a fração foi muito inferior ao adicionado de BHA a 0,02%, demonstrando a elevada atividade antioxidante de resíduos de tomate na oxidação lipídica.

### **2.3.5 Atividade antimicrobiana**

Os extratos de resíduos agroindustriais, obtidos com os cinco solventes, foram submetidos ao teste de difusão em ágar contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600 e *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104 para o *screening* de atividade antimicrobiana. Os extratos tiveram seus solventes evaporados em rotaevaporador à 45°C e a massa resultante rediluída na concentração testada.

Não foi observado halo de inibição em nenhum dos ensaios, com extratos à concentração de 32 mg/mL. Frente a estes resultados, outros testes mais específicos para avaliação da atividade antimicrobiana (MIC e MBC) não foram feitos.

Embora o estudo de Ozkan et al. (2004) mostre a presença de atividade antimicrobiana de extratos de bagaços de uva, muitas variáveis tais como, variedade, método de extração, bactérias testadas, concentração do extrato e composição fenólica das amostras podem influenciar o resultado final. De modo que, outros autores (BAYDAR et al., 2004), assim como neste trabalho, também não encontraram resultados positivos para extratos de bagaços de uva.

A maior parte dos estudos que encontram atividade antimicrobiana usa somente as sementes desengorduradas, onde há maior concentração de compostos fenólicos (CORRALES et al., 2009; BAYDAR et al., 2006; JAYAPRAKASHA, et al., 2003). Diante disto, a própria composição das amostras, principalmente a dos resíduos vinícolas, ricos em açúcares, lipídeos e outros, pode ter sido uma das causas do resultado negativo verificado nesta análise, já que estes compostos majoritários podem funcionar como diluidores dos compostos fenólicos presentes, primordiais para a expressão da atividade antimicrobiana.

### **2.3.6 Composição química dos extratos etanólicos e aquosos de resíduos agroindustriais por CG-EM**

Os extratos etanólicos e aquosos foram purificados em cartuchos SPE-LC18 para eliminar interferentes, principalmente açúcares, que pudessem dificultar ou impedir a

identificação dos compostos de interesse pela técnica de cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (CG-EM).

A extração em fase sólida é uma boa opção para realizar procedimentos de limpeza de extratos brutos de plantas e amostras biológicas. É um método rápido e reprodutível, além de requerer pequenos volumes de amostra. Para a concentração de ácidos fenólicos e flavonóides é comumente utilizada sílica C<sub>18</sub> como sorvente. A amostra e os solventes aplicados são acidificados para prevenir a ionização dos compostos fenólicos, o que diminuiria sua retenção (STALIKAS, 2007).

Entretanto, um dos problemas encontrados no uso dessa técnica foi a quantidade limitada de amostra coletada da coluna após a limpeza, que variou conforme o grau de impureza dos extratos. Para alguns deles, o volume aplicado nos cartuchos foi insuficiente para a recuperação de massa capaz de gerar cromatogramas com boa intensidade de sinal na análise cromatográfica, mesmo operando em modo “*splitless*”.

A fração coletada da SPE foi derivatizada e analisada em CG-EM. Para a derivatização das amostras foi testada a eficácia de dois reagentes, o BSTFA (bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida) e o MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida), este último escolhido por apresentar cromatogramas de melhor resolução e intensidade. Além disso, também testou-se o tempo necessário à reação, fixando-se 10 ao invés de 30 minutos em estufa à 70°C, tempo até então adotado para as análises em CG-EM. Os compostos identificados estão apresentados na tabela 11.



Tabela 11 – Tempos de retenção, porcentagem de cada componente e íons importantes do espectro de massa dos compostos fenólicos silanizados presentes nos extratos etanólicos e aquosos dos resíduos agroindustriais, por CG-EM

Compostos	tR (min)	Área (%)													Íon ( <i>m/z</i> , abundância entre parênteses)
		Resíduos agroindustriais (extratos etanólicos <sup>(E)</sup> /aquosos <sup>(A)</sup> )													
		Bagaço Isabel	Bagaço P. Verdot	Bagaço Cabernet S	Bagaço Pinot Noir	Borra tinta	Bagaço Moscato	Bagaço Verdejo	Engaço branco (PE)	Engaço branco	Engaço tinto (PE)	Engaço tinto	Bagaço Goiaba	Bagaço Tomate	
Ácido 2-hidroxibenzóico	7,43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,63 <sup>(E)</sup>	-	0,46 <sup>(E)</sup>	73 (100), 267 (75), 232 (26), 268 (20), 45 (18); 282(M <sup>+</sup> )	
Ácido 4-hidroxibenzóico	8,10	0,05 <sup>(A)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,43 <sup>(A)</sup>	267 (100), 223 (88), 73 (79), 193 (48), 282 (27); 282(M <sup>+</sup> )	
Ácido 2,6- dihidroxibenzóico	8,22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,11 <sup>(A)</sup>	73 (100), 355 (41), 255 (33), 267 (31), 270 (29); 371(M <sup>+</sup> )	
Ácido isovanílico	8,88	0,32 <sup>(E)</sup> 0,47 <sup>(A)</sup>	-	0,43 <sup>(A)</sup>	0,09 <sup>(E)</sup> 0,16 <sup>(A)</sup>	1,17 <sup>(E)</sup> 1,29 <sup>(A)</sup>	-	-	-	-	-	0,35 <sup>(E)</sup>	-	73 (100), 217 (57), 297 (49), 267 (46), 253 (32); 312(M <sup>+</sup> )	
Ácido vanílico	8,88	-	-	0,68 <sup>(E)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	1,37 <sup>(A)</sup>	73 (100), 297 (91), 267 (60), 312 (46), 223 (44); 312(M <sup>+</sup> )	
Ácido 2,4 - dihidroxibenzóico	8,93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,73 <sup>(E)</sup>	355 (100), 73 (92), 356 (32), 357 (17), 45 (14); 371(M <sup>+</sup> )
Ácido 2,5 - dihidroxibenzóico	8,93	0,07 <sup>(A)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,33 <sup>(A)</sup>	355 (100), 73 (63), 356 (28), 357 (12), 45 (10); 371(M <sup>+</sup> )	
Ácido protocatequínico	9,17	-	0,06 <sup>(E)</sup>	0,18 <sup>(E)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,38 <sup>(E)</sup>	73 (100), 193 (55), 217 (42), 75 (24), 370 (24); 370(M <sup>+</sup> )
Ácido siríngico	9,58	-	0,18 <sup>(E)</sup> 0,18 <sup>(A)</sup>	0,67 <sup>(E)</sup>	0,13 <sup>(E)</sup> 0,37 <sup>(A)</sup>	1,13 <sup>(E)</sup> 1,12 <sup>(A)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	327 (100), 73 (85), 342 (71), 312 (67), 297 (64); 342(M <sup>+</sup> )
Ácido m-cumárico	9,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,02 <sup>(E)</sup>	73 (100), 324 (51), 293 (36), 204 (26), 294 (25); 308(M <sup>+</sup> )
Ácido-p-cumárico	9,8	0,74 <sup>(E)</sup> 1,31 <sup>(A)</sup>	-	0,87 <sup>(E)</sup>	-	3,42 <sup>(E)</sup>	0,21 <sup>(E)</sup> 0,27 <sup>(A)</sup>	-	0,11 <sup>(E)</sup>	0,14 <sup>(E)</sup>	-	0,12 <sup>(E)</sup>	-	1,76 <sup>(E)</sup> 2,23 <sup>(A)</sup>	73 (100), 293 (59), 219 (54), 308 (45), 249 (38); 308(M <sup>+</sup> )
Ácido hidrocaféico	9,85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,37 <sup>(E)</sup> 0,58 <sup>(A)</sup>	179 (100), 73 (94), 398 (77), 267 (50), 399 (25); 398(M <sup>+</sup> )
Ácido gálico	9,89	2,07 <sup>(E)</sup> 1,36 <sup>(A)</sup>	2,63 <sup>(E)</sup> 0,80 <sup>(A)</sup>	3,67 <sup>(E)</sup> 2,08 <sup>(A)</sup>	0,70 <sup>(E)</sup> 1,21 <sup>(A)</sup>	6,14 <sup>(E)</sup> 0,49 <sup>(A)</sup>	3,26 <sup>(E)</sup> 4,51 <sup>(A)</sup>	8,59 <sup>(E)</sup> 1,83 <sup>(A)</sup>	5,27 <sup>(E)</sup> 4,52 <sup>(A)</sup>	1,55 <sup>(E)</sup> 3,20 <sup>(A)</sup>	4,92 <sup>(E)</sup> 4,67 <sup>(A)</sup>	1,77 <sup>(E)</sup> 2,80 <sup>(A)</sup>	3,65 <sup>(E)</sup>	0,62 <sup>(E)</sup>	281 (100), 73 (97), 458 (64), 443 (28), 459 (25); 458(M <sup>+</sup> )
Ácido ferúlico	10,7	-	-	-	-	0,32 <sup>(E)</sup> 0,17 <sup>(A)</sup>	-	0,18 <sup>(E)</sup>	-	0,14 <sup>(E)</sup>	0,36 <sup>(E)</sup>	-	-	0,59 <sup>(E)</sup> 0,47 <sup>(A)</sup>	338 (100), 73 (78), 308 (54), 323 (53), 249 (39); 338(M <sup>+</sup> )
Ácido caféico	10,95	0,82 <sup>(E)</sup> 1,77 <sup>(A)</sup>	0,08 <sup>(E)</sup> 0,24 <sup>(A)</sup>	0,35 <sup>(E)</sup> 0,20 <sup>(A)</sup>	-	4,79 <sup>(E)</sup> 4,21 <sup>(A)</sup>	1,38 <sup>(E)</sup> 0,28 <sup>(A)</sup>	0,20 <sup>(E)</sup>	-	0,32 <sup>(E)</sup>	-	0,34 <sup>(E)</sup>	-	2,52 <sup>(E)</sup> 3,06 <sup>(A)</sup>	219 (100), 73 (82), 396 (76), 397 (27), 381 (21); 396(M <sup>+</sup> )
Ácido sinápico	11,70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,19 <sup>(E)</sup> 0,10 <sup>(A)</sup>	368 (100), 338 (95), 73 (75), 353 (57), 369 (32); 368(M <sup>+</sup> )
Resveratrol	15,74	0,94 <sup>(E)</sup>	-	0,16 <sup>(E)</sup>	-	0,51 <sup>(E)</sup>	-	0,40 <sup>(E)</sup>	0,77 <sup>(E)</sup>	4,07 <sup>(E)</sup>	9,53 <sup>(E)</sup>	3,19 <sup>(E)</sup>	-	-	444 (100), 73 (84), 445 (36), 446 (18), 443 (13); 444(M <sup>+</sup> )
Epicatequina (pico 1)	17,2	19,17 <sup>(E)</sup> 25,50 <sup>(A)</sup>	40,84 <sup>(E)</sup> 36,82 <sup>(A)</sup>	32,52 <sup>(E)</sup> 23,69 <sup>(A)</sup>	26,73 <sup>(E)</sup> 29,28 <sup>(A)</sup>	15,08 <sup>(E)</sup> 18,82 <sup>(A)</sup>	2,85 <sup>(E)</sup> 4,58 <sup>(A)</sup>	3,43 <sup>(E)</sup> 7,54 <sup>(A)</sup>	3,50 <sup>(E)</sup>	0,95 <sup>(E)</sup>	-	5,20 <sup>(E)</sup>	-	-	368 (100); 73 (93), 307 (43), 355 (39), 369 (31); 650(M <sup>+</sup> )
Epicatequina (pico 2)	17,43	54,26 <sup>(E)</sup> 42,33 <sup>(A)</sup>	47,24 <sup>(E)</sup> 41,66 <sup>(A)</sup>	18,27 <sup>(E)</sup> 23,77 <sup>(A)</sup>	62,62 <sup>(E)</sup> 47,88 <sup>(A)</sup>	13,72 <sup>(E)</sup> 16,45 <sup>(A)</sup>	13,04 <sup>(E)</sup> 9,20 <sup>(A)</sup>	40,27 <sup>(E)</sup> 53,78 <sup>(A)</sup>	46,01 <sup>(E)</sup> 16,58 <sup>(A)</sup>	26,47 <sup>(E)</sup> 23,31 <sup>(A)</sup>	8,92 <sup>(E)</sup> 19,74 <sup>(A)</sup>	45,78 <sup>(E)</sup> 1,17 <sup>(A)</sup>	0,67 <sup>(E)</sup> 1,96 <sup>(A)</sup>	-	368 (100); 73 (64), 355 (36), 369 (29), 370 (13); 650(M <sup>+</sup> )
Kaempferol	19,34	-	-	0,36 <sup>(E)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,46 <sup>(E)</sup> 0,41 <sup>(A)</sup>	559 (100), 560 (47), 561 (27), 73 (25), 562 (9); 574(M <sup>+</sup> )
Quercetina	20,6	0,37 <sup>(E)</sup> 0,38 <sup>(A)</sup>	0,22 <sup>(E)</sup>	4,80 <sup>(E)</sup>	0,36 <sup>(E)</sup> 0,09 <sup>(A)</sup>	2,29 <sup>(E)</sup> 0,36 <sup>(A)</sup>	3,87 <sup>(E)</sup> 7,04 <sup>(A)</sup>	0,75 <sup>(E)</sup> 1,30 <sup>(A)</sup>	0,51 <sup>(E)</sup>	0,28 <sup>(E)</sup>	-	3,34 <sup>(E)</sup>	4,56 <sup>(E)</sup> 1,11 <sup>(A)</sup>	25,98 <sup>(E)</sup> 20,35 <sup>(A)</sup>	647 (100), 648 (57), 73 (68), 649 (33), 650 (13); 662(M <sup>+</sup> )

Ao analisar os cromatogramas obtidos dos extratos etanólicos e aquosos (figuras 26 a 51), nota-se que em todos os resíduos derivados de uva, tanto branca quanto tinta, há picos proeminentes do flavonóide epicatequina, sugerindo que este composto participa de forma determinante na expressão da atividade antioxidante destas amostras.

O arranjo e número de grupos hidroxila de um composto influenciam sua capacidade em doar H e elétrons, de forma que esta habilidade e, como consequência, sua atividade antioxidante, são aumentadas pelo aumento do número desses grupos no fenol (LAFKA; SINANOGLU; LAZOS, 2007). A epicatequina possui um total de cinco hidroxilas distribuídas de forma a criar uma estrutura orto-dihidroxi (catecol no anel B) que contribui para o deslocamento de elétrons, conferindo alta estabilidade à molécula, além de ser a estrutura mais ativa em doar átomos de hidrogênio para os radicais livres. Além disso, os outros 3 grupos hidroxila livres distribuídos nos anéis A e C também participam na doação de H e na estabilização da molécula pela formação de pontes de H e deslocação de elétrons (FERNANDEZ-PANCHON et al., 2008; LAFKA; SINANOGLU; LAZOS, 2007). A epicatequina caracteriza-se, assim, por ser uma substância de excepcional poder antioxidante (Figura 25).

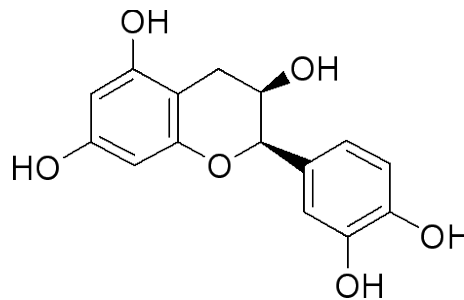


Figura 25 – Molécula do flavonóide epicatequina

Destaca-se ainda a presença de vários outros compostos fenólicos (ácido gálico, caféico, ferúlico, vanílico, p-cumárico, protocatequínico, siríngico, resveratrol, quercetina) que podem ter contribuído para o potencial bioativo dos resíduos agroindustriais analisados, seja de forma independente ou por meio de sinergismos.

Muitos destes compostos também foram identificados por HPLC em estudo feito por Lafka et al. (2007) com bagaço de uva Agiorgitiko, Rubilar et al. (2007) com bagaço de Cabernet Sauvignon e Thimothe et al. (2007) com bagaços de Pinot Noir, Cabernet Franc, Baco Noir e Noiret.

Pouca diferença foi encontrada entre os perfis químicos dos extratos etanólico e aquoso. O resveratrol, por exemplo, foi identificado na fração etanólica de alguns dos resíduos vinícolas, mas não na aquosa. Ácido gálico e epicatequina foram identificados em todas as amostras, exceto nos extratos aquosos de bagaço de goiaba e tomate. Nestes resíduos, a quercetina foi o fenólico majoritário.

Embora seja apenas uma análise qualitativa, é possível perceber a riqueza de compostos fenólicos dos resíduos agroindustriais estudados. Ao tomar como referência dados quantitativos de caracterização química de alguns desses materiais, pode-se estimar o total de compostos bioativos que são descartados. Em estudo desenvolvido por Ruberto et al. (2007), extrato de bagaço de uva Cabernet Sauvignon apresentou em sua composição 0,019 mg de quercetina por grama do bagaço seco. Ao considerar o montante de resíduos vinícolas gerados anualmente em todo o mundo, cerca de 9,6 milhões de toneladas da matéria bruta (LAFKA; SINANOGLU; LAZOS, 2007) e 2,4 milhões de toneladas de matéria-seca, levando-se em conta uma média de 75% de umidade, é estimado que são descartadas aproximadamente 46 toneladas de quercetina provenientes de resíduos vinícolas em todo o mundo. Ao somar os percentuais de área dos dois picos de epicatequina identificados no extrato etanólico do bagaço de Cabernet Sauvignon (Tabela 11), verifica-se que o valor é cerca de dez vezes maior do que o referente à quercetina. Isso leva a crer que a quantia descartada desse composto seja condizente a essa ordem de grandeza.

Os resultados obtidos mostram que os resíduos agroindustriais analisados são, no geral, ricos em compostos bioativos, particularmente ácidos fenólicos e flavonóides, como pôde ser confirmado pela análise em CG-EM. Apresentam elevada atividade antioxidante e, por conseguinte, potenciais fontes alternativas para aplicação na indústria de alimentos.

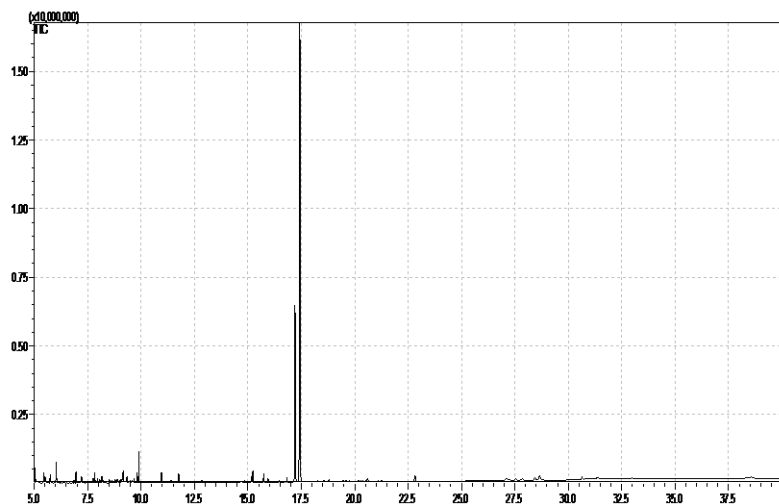


Figura 26 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato etanólico – Bagaço (Isabel)

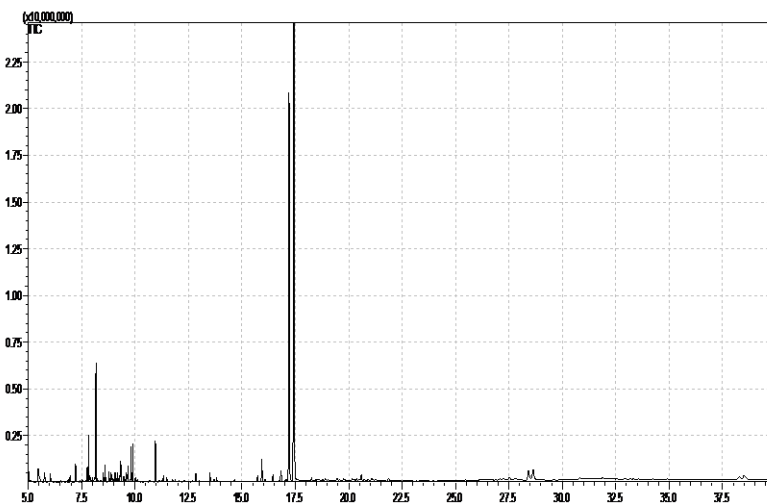


Figura 27 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato aquoso – Bagaço (Isabel)

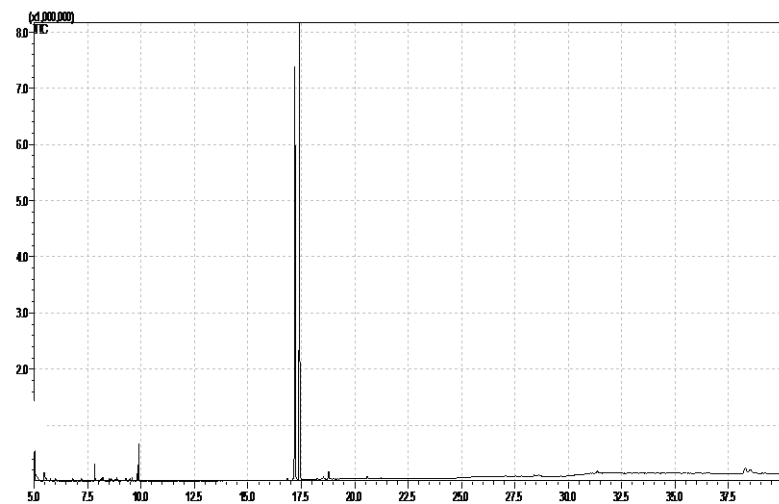


Figura 28 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato etanólico – Bagaço (Petit Verdor)

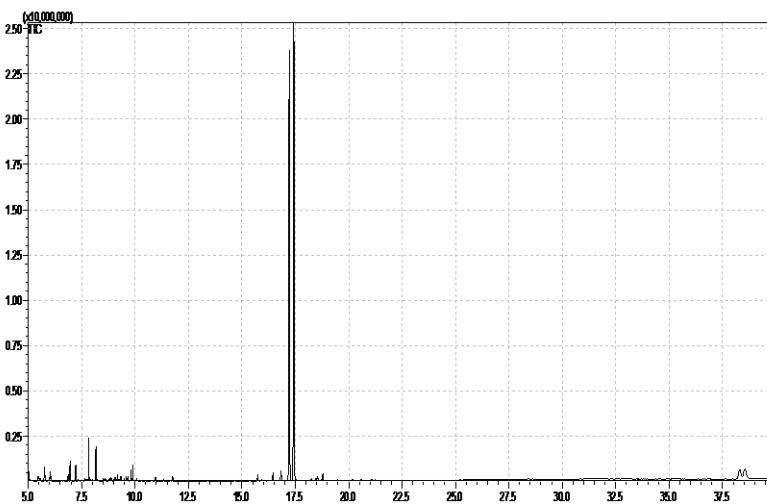


Figura 29 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato aquoso – Bagaço (Petit Verdor)

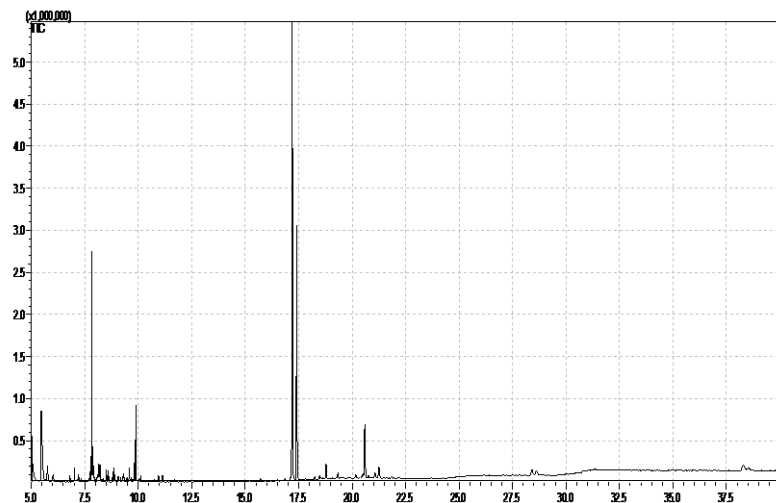


Figura 30 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato etanólico – Bagaço (C. Sauvignon)

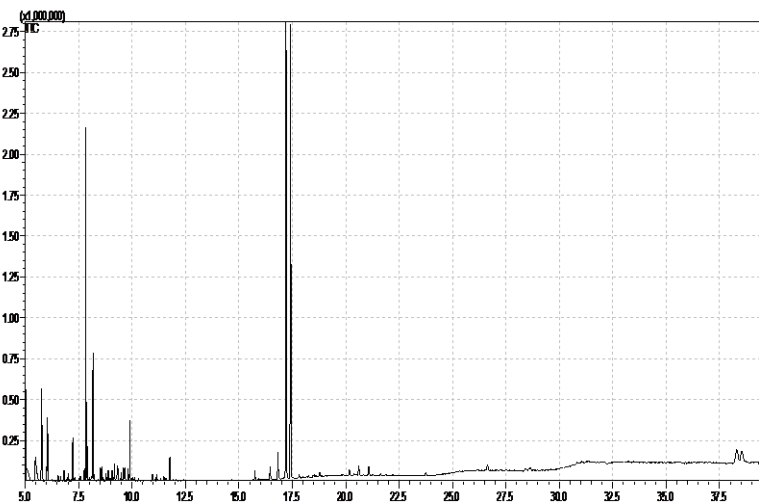


Figura 31 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato aquoso – Bagaço (C. Sauvignon)

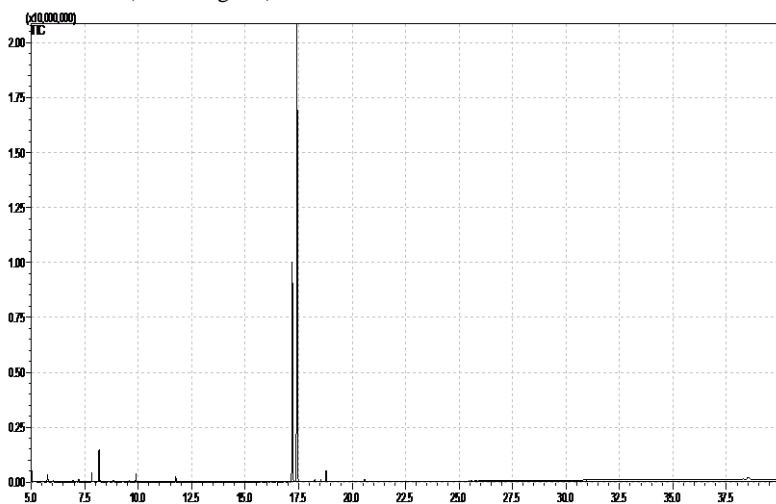


Figura 32 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato etanólico – Bagaço (Pinot Noir)

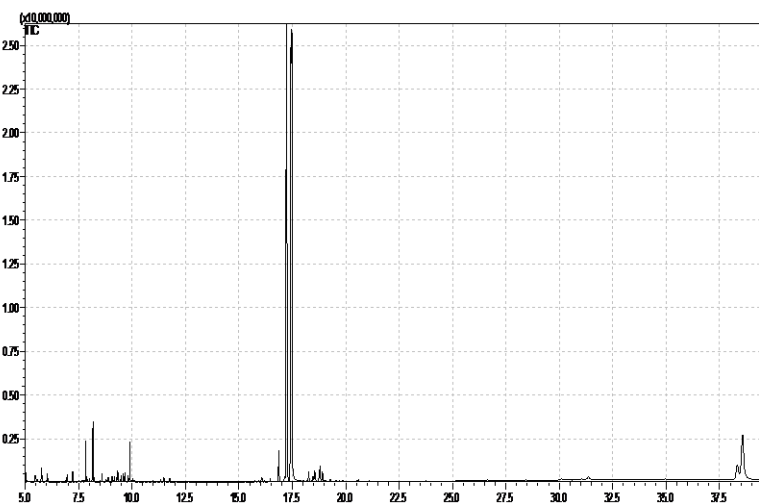


Figura 33 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato aquoso – Bagaço (Pinot Noir)

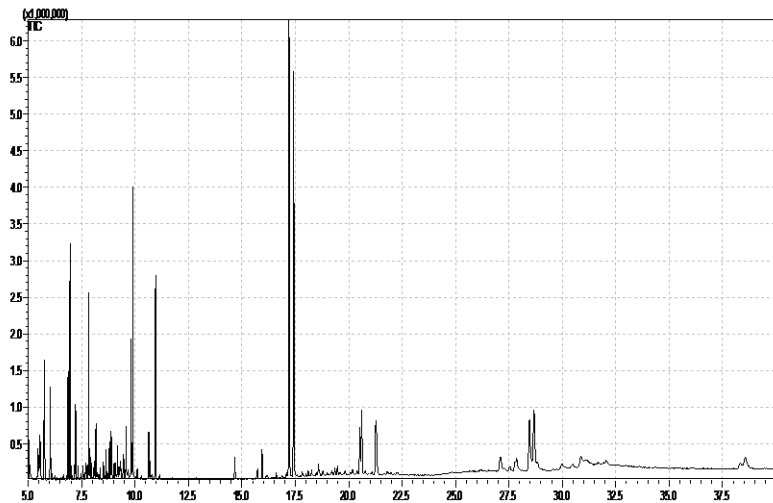


Figura 34 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato etanólico – Borra tinta

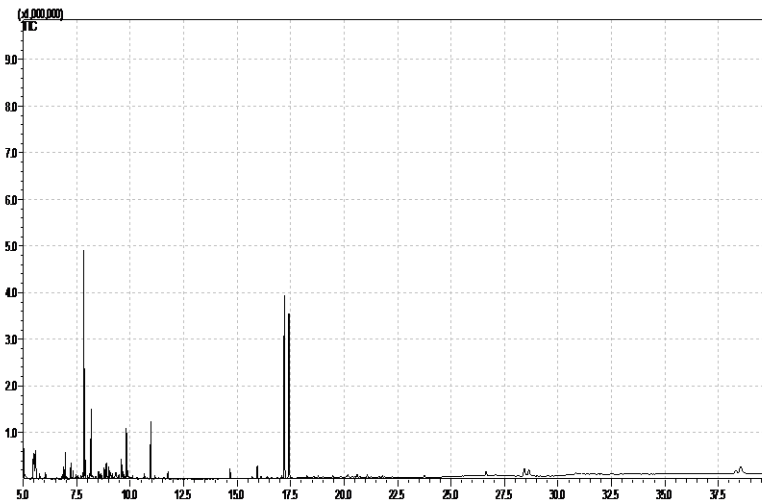


Figura 35 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato aquoso – Borra tinta

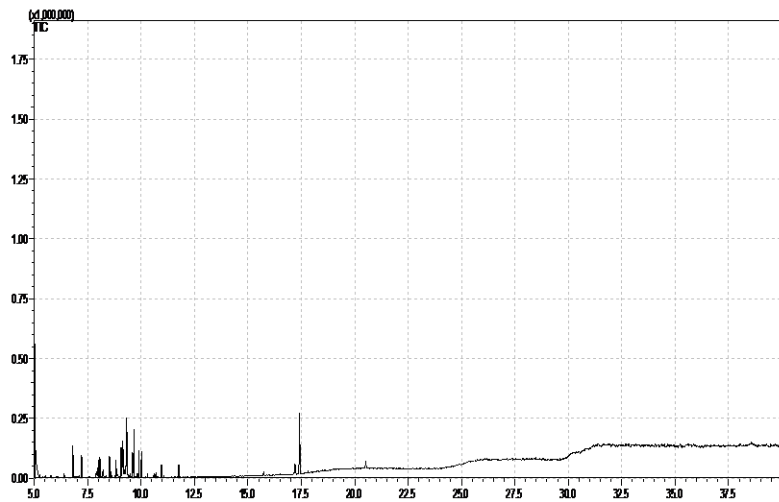


Figura 36 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato etanólico – Bagaço (Moscatto)

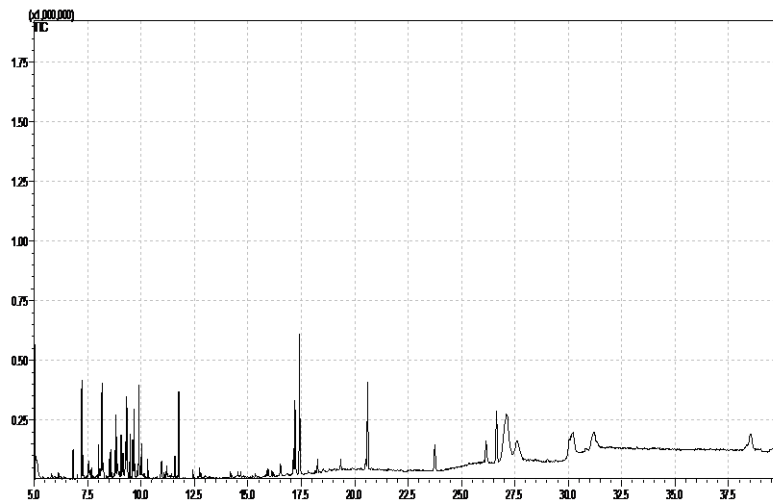


Figura 37 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato aquoso – Bagaço (Moscatto)

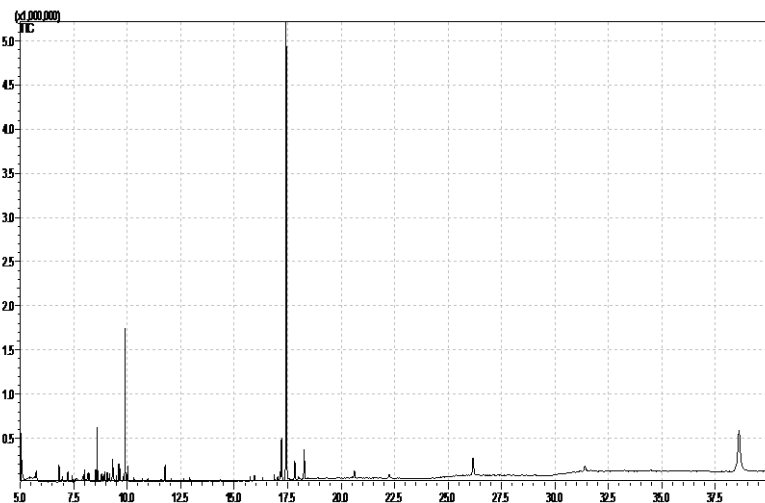


Figura 38 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato etanólico – Bagaço (Verdejo)

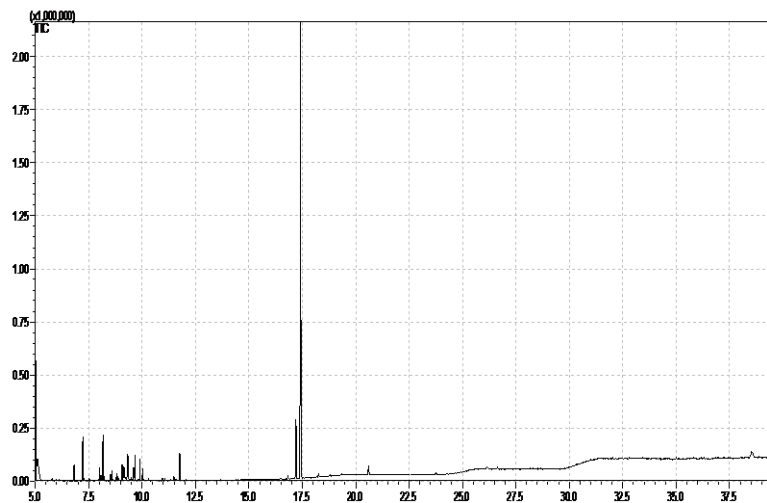


Figura 39 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato aquoso – Bagaço (Verdejo)

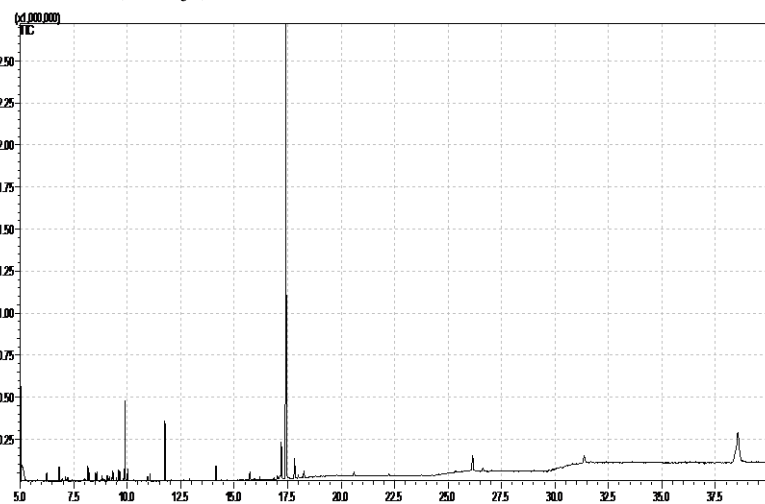


Figura 40 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato etanólico – Engaço branco (Petrolina)

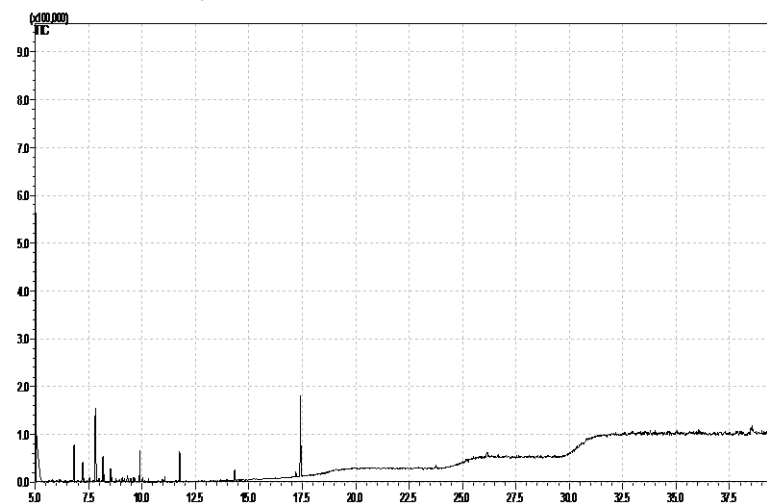


Figura 41 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato aquoso – Engaço branco (Petrolina)

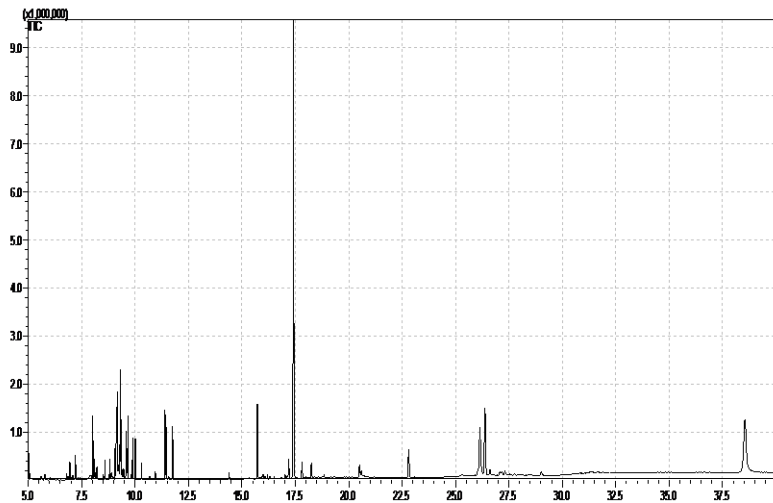


Figura 42 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato etanólico – Engaço branco

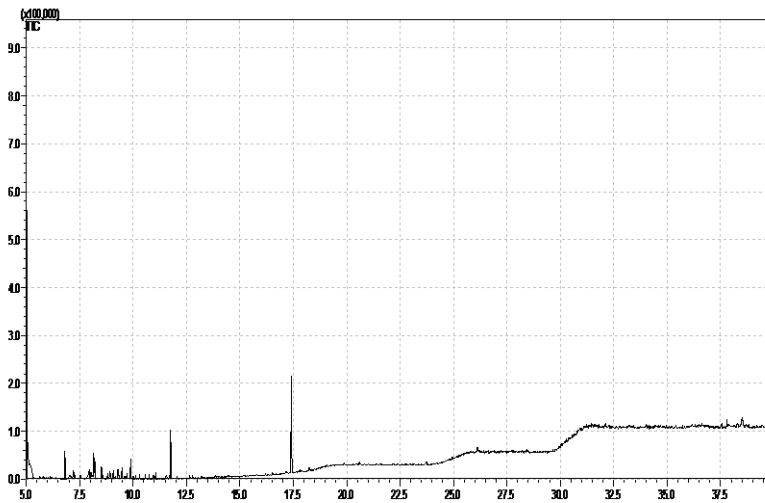


Figura 43 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato aquoso – Engaço branco

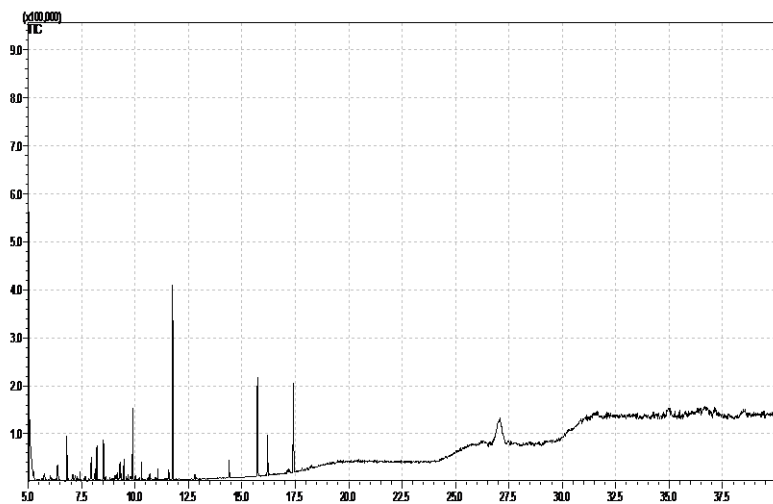


Figura 44 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato etanólico – Engaço tinto (Petrolina)

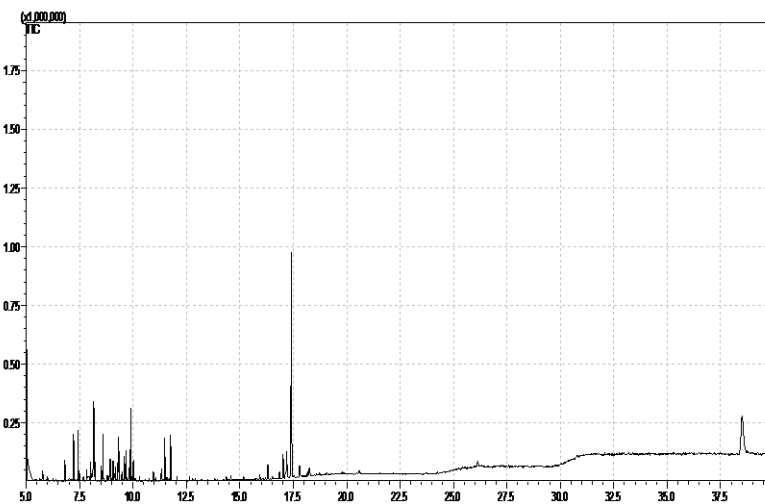


Figura 45 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato aquoso – Engaço tinto (Petrolina)



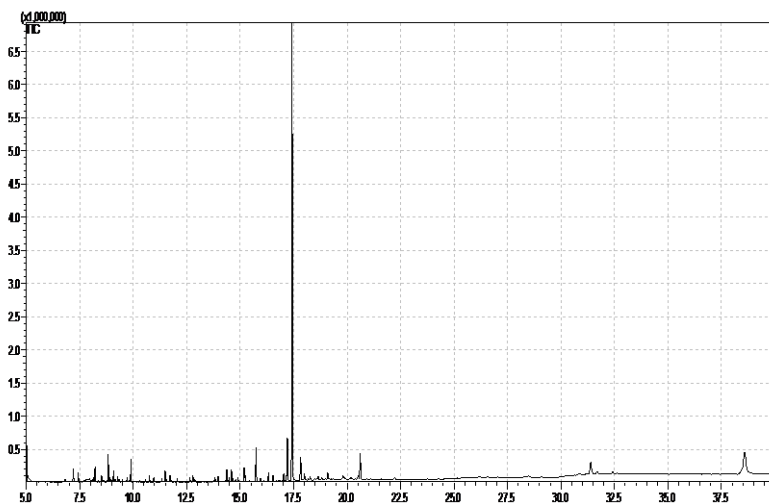


Figura 46 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato etanólico – Engaço tinto

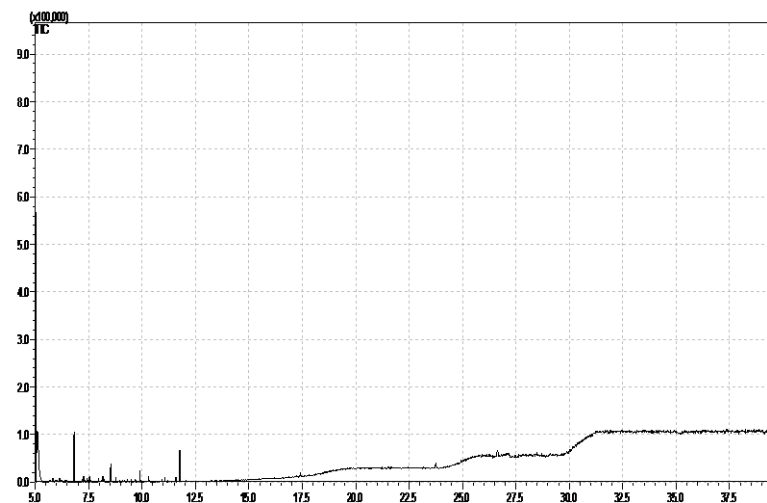


Figura 47 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato aquoso – Engaço tinto

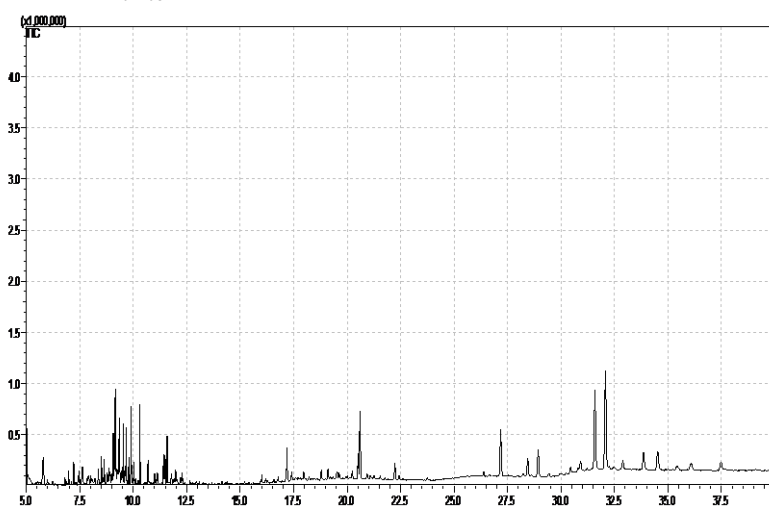


Figura 48 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato etanólico – Bagaço goiaba

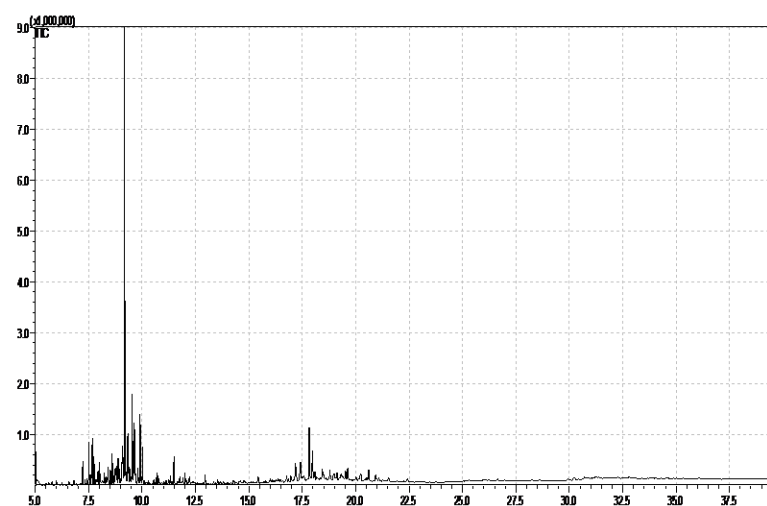


Figura 49 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato aquoso – Bagaço goiaba

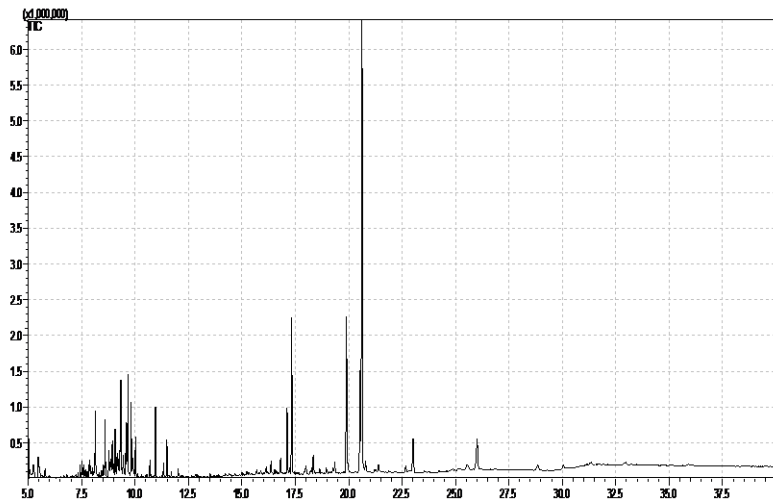


Figura 50 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato etanólico – Bagaço tomate

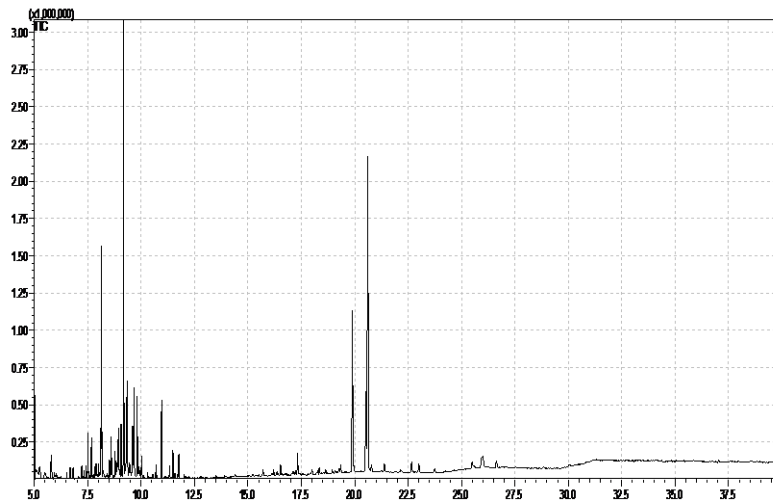


Figura 51 – Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato aquoso – Bagaço tomate



### 3 CONCLUSÕES

Os solventes de maior polaridade (etanol 80% seguido pela água) são mais eficazes na extração de compostos fenólicos.

Diferenças na composição química das amostras influenciam a expressão da atividade antioxidante em meios polares e apolares. Nos ensaios DPPH e ABTS, engaço branco e bagaço Pinot Noir apresentaram as maiores atividades. Na auto-oxidação do beta-caroteno e Rancimat, os bagaços de Cabernet Sauvignon, Pinot Noir, tomate e engaço branco (Petrolina) foram os mais eficazes na proteção oxidativa de sistemas lipídicos, assemelhando-se ao antioxidante sintético utilizado como padrão BHT.

Os extratos dos resíduos agroindustriais analisados não apresentaram ação antimicrobiana, nas condições em que foram testados, porém alta vocação para ação antioxidante.

Com exceção do bagaço de tomate, a epicatequina foi identificada em todos os resíduos em diferentes percentuais e, majoritariamente, nos vinícolas. Além dela, muitos outros compostos fenólicos estão presentes (ácido gálico, caféico, ferúlico, vanílico, p-cumárico, protocatequínico, siríngico, resveratrol, kaempferol, quercetina).

Potentes antioxidantes são descartados em grande quantidade durante as cadeias produtivas agroindustriais, já que a maior parte das amostras analisadas, particularmente os resíduos vinícolas, é rica em compostos bioativos, como pôde ser confirmado na análise de CG-EM. Diante disso, esses resíduos podem ser considerados uma fonte barata e amplamente disponível para extração de compostos fenólicos. Esses, por sua vez, são passíveis de serem incorporados nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica, sob evidente respaldo de estudos de extração em escala industrial e aplicação, gerando, assim, maiores ganhos econômicos e menores impactos ambientais.



## REFERÊNCIAS

- ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L.; PAREDES, J. G.; PARK, Y. K. Chemical composition of *Baccharis dracunculifolia*, the botanical source of propolis from the states of São Paulo and Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 909-915, Jan., 2005.
- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. AOCS. **Official methods and recommend practices of the American oil chemist's society**. 7 th ed. Champaign, 2003.
- AMIN, I.; MUKHRIZAH, O. Antioxidant capacity of methanolic and water extracts prepared from food-processing by-products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 86, p. 778–784, Jan., 2006.
- APARICIO, R.; RODA, L.; ALBI, M.A.; GUTIERREZ, F. Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, p. 4150-4155, Sept., 1999.
- ARNAO, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 11, p. 419–421, Nov., 2000.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence and potencial uses. **Food Chemistry**, Barking, v. 99, p. 191 – 203, July, 2006.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, p. 113-123, jan/fev., 2006.
- BAYDAR, N.G.; ÖZKAN, G.; SADGIÇ, O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. **Food Control**, Guildford, v. 15, p. 335–339, July, 2004.
- BAYDAR, N.G.; SAGDIC, O.; OZKAN, G.; CETIN, S. Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extracts. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 41, n. 7, p. 799-804, June, 2006.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição de Campinas**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, maio/ago, 1999.
- BLOOR, S.J. Overview of methods for analisys and identification of flavonoids. **Methods in Enzymology**, New York, v. 335, p. 3-14, Nov., 2001.
- BLUMA, R.V.; ETCHEVERRY, M.G. Application of essential oils in maize grain: Impact on Aspergillus section Flavi growth parameters and aflatoxin accumulation. **Food Microbiology**, London, v. 25, p. 324-334, Feb., 2008.
- BONATTO, P.S. Cromatografia gasosa. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATTO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora UNICAMP, 2006.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA – CEPEA. **Valores do PIB do agronegócio brasileiro, 1994 a 2008**. ESALQ-USP, 2010. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/pib/>>. Acesso em 02 jun. 2010.

CORRALES, M.; HAN, J.H.; TAUSCHER, B. Antimicrobial properties of grape seed extracts and their effectiveness after incorporation into pea starch films. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 44, p. 425–433, Jan., 2009.

CORREIA, R.T.P.; MCCUE, P.; MAGALHÃES, M.M.A.; MACÊDO, G.R.; SHETTY, K. Phenolic antioxidant enrichment of soy flour-supplemented guava waste by *Rhizopus oligosporus* – mediated solid-state bioprocessing. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 28, p. 404-418, Dec., 2004.

DEL VALLE, M.; CÁMARA, M.; TORIJA, M.E. Chemical characterization of tomato pomace. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 86, p. 1232–1236, May, 2006.

\_\_\_\_\_. The nutritional and functional potential of tomato by-products. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.1, p. 165-172, 2007. Suplemento apresentado no INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE PROCESSING TOMATO, 10:2007, Tunis, v. 1.

DEMIRCI, A.; KOSAR, M.; DEMIRCI, F.; DINÇ, M.; BASER, K.H.C. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Chaerophyllum libanoticum* Boiss. et Kotschy. **Food Chemistry**, Barking, v. 105, p. 1512–1517, May, 2007.

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 17, p. 505–512, Sept., 2006.

DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W.H.; HAYACIBARA, M.F.; CURY, J.A.; IKEGAKI, M.; PARK, Y.K.; ROSALEN, P.L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 26, n. 4, p. 527-531, Apr., 2003.

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

EMBRAPA. **Cultivo de tomate para industrialização**, 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial/importancia.htm>>. Acesso em: 02 jun. 2010.

\_\_\_\_\_. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Fortaleza, 2007. 4 p.

EMMONS, C.L.; PETERSON, D.M.; PAUL, G.L. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. *In vitro* antioxidant activity and content of phenolic and tocol antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, p. 4894-4898, Nov., 1999.

FAOSTAT. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>>. Acesso em: 02 jun. 2010.

FARHOOSH, R.; NIAZMAND, R.; REZAEI, M.; SARABI, M. Kinetic parameter determination of vegetable oil oxidation under Rancimat test conditions. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 110, p. 587–592, May, 2008.

FERNANDEZ-PANCHON, M.S.; VILLANO, D.; TRONCOSO, A.M.; GARCIA-PARRILLA. Antioxidant activity of phenolic compounds: from *in vitro* results to in vivo evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 48, p. 649-671, Aug., 2008.

FERRERES, F.; KRŠKOVA, Z.; GONÇALVES, R.F.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J.A.; DUSEK, J.; MARTIN, J.; ANDRADE, P.B. Free water-soluble phenolics profiling in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 2405-2409, Feb., 2009.

FRANCISCO, V.L.F.S.; BAPTISTELLA, C.S.L.; AMARO, A.A. **A cultura da goiaba em São Paulo**. 2005. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=1902>>. Acesso em: 03 de jun de 2010.

FRUSCIANTE, L.; CARLI, P.; ERCOLANO, M.R.; PERNICE, R.; DI MATTEO, A.; FOGLIANO, V.; PELLEGRINI, N. Antioxidant nutritional quality of tomato. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 51, p. 609-617, Apr., 2007.

GÖKTÜRK, B. N.; OZKAN, G.; SAGDIÇ, O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. **Food Control**, Guildford, v. 15, p. 335–339, July, 2004.

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**, Easton, v. 52, p. 234-238, Jan., 2004.

GORINSTEIN, S.; MARTÍN-BELLOSO, O.; LOJEK, A.; CÍZ, M.; SOLIVA-FORTUNY, R.; PARK, Y.-S.; CASPI, A.; LIBMAN, I.; TRAKHTENBERG, S. Comparative content of some phytochemicals in Spanish apples, peaches and pears. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 82, p. 1166–1170, July, 2002.

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovascular Research**, London, v. 47, n. 3, p. 410-418, Aug., 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/industria/pimpfagro\\_nova/agrocomede2009.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/industria/pimpfagro_nova/agrocomede2009.pdf)>. Acesso em: 03 jun. 2010.



\_\_\_\_\_. **Censo agropecuário 2006**: Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Rio de Janeiro, 2009. 777 p.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA – IPEA. **Desempenho e crescimento do agronegócio no Brasil**. Brasília, 2004. 43 p.

JACOB, K.; PERIAGO, M.J.; BÖHM, V.; BERRUEZO, G.R. Influence of lycopene and vitamin C from tomato juice on biomarkers of oxidative stress and inflammation. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 99, p. 137-146, Jan., 2008.

JAYAPRAKASHA, G.K.; SELVI, T.; SAKARIAH, K.K.. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. **Food Research International**, Essex, v. 36, p. 117–122, Jan., 2003.

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

JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; RINCÓN, M.; PULIDO, R.; SAURA-CALIXTO, F. Guava Fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 5489-5493, Sept., 2001.

KIOKIAS, S.; VARZAKAS, T.; OREOPOULOU, V. *In vitro* activity of vitamins, flavonoids, and natural phenolic antioxidants against the oxidative deterioration of oil-based systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 48, n. 1, p. 78-93, Jan., 2008.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; AMBROSANO, G. M. B.; MURATA, R. M.; YATSUDA, R.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; PARK, Y. K. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutants *Streptococci*. **Current Microbiology**, New York, v. 41, n. 3, p. 192-196, Sept., 2000.

KRANL, K.; SCHLESIER, K.; BITSCH, R.; HERMANN, H.; ROHE, M.; BOHM, V. Comparing antioxidative food additives and secondary plant products – use different assay. **Food Chemistry**, Barking, v. 93, p. 171-175, Jan., 2005.

LAFKA, T.I.; SINANOGLU, V.; LAZOS, E.S. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. **Food Chemistry**, Barking, v. 104, p. 1206-1214, Feb., 2007.

LEONG, L.P.; SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. **Food Chemistry**, Barking, v. 76, p. 69-75, Jan., 2002.

LIU, Q.; YAO, H. Antioxidant activities of barley seeds extracts. **Food Chemistry**, Barking, v. 102, p. 732–737, Jan., 2007.

- LLOBERA, A.; CAÑELLAS, J. Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. **Food Chemistry**, Barking, v. 101, p. 659-666, Jan., 2007.
- LU, J.; ZHAO, H.; CHEN, J.; FAN, W.; DONG, J.; KONG, W.; SUN, J.; CAO, Y.; CAI, G. Evolution of phenolic compounds and antioxidant activity during malting. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 55, p. 10994–11001, Nov., 2007.
- MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. The sistematic identification of flavonoids. **Journal of Molecular Structure**, Berlin: Springer-Verlag, v. 10, Nov., 1971. 354 p.
- 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**, San Diego, v. 20, p. 125-132, Mar., 2007.
- MALECKA, M. Antioxidant properties of the unsaponifiable matter isolated from tomato seeds, oat grains and wheat germ oil. **Food Chemistry**, Barking, v. 79, p. 327-330, Nov., 2002.
- MELLO, L. M. R. **Produção e comercialização de uvas e vinhos**: panorama 2005. Embrapa Uva e Vinho – Artigo Técnico, 2006. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/panorama2005-producao.pdf>>. Acesso em: 21 de mai de 2010.
- MELO, P.C.T.; VILELA, N.J. Desafios e perspectivas para a cadeia brasileira de tomate para processamento industrial. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 154-157, jan./mar., 2005.
- MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; DOS SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, London, v. 15, p. 127–130, Mar., 2001.
- MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 15, n. 4, p. 316-320, out./dec., 2005.
- MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 1655–1666, Jan., 2009.
- MORAES-DE-SOUZA, R.A. **Potencial antioxidante e composição fenólica de infusões de ervas consumidas no Brasil**. 2007. 59 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J.M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NUÑEZ, M.J.; PARAJÓ, J.C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, Barking, v. 72, p. 145-171, Feb., 2001.

MURCIA, M.A.; JIMENEZ, A.M.; MATINEZ-TOME. Evaluation of the antioxidant properties of mediterranean and tropical fruits compared with common food additives. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 64, n. 12, p. 2037-2046, Dec., 2001.

OLDONI, T.L.C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. 2007. 104 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

OWEN, T. **Fundamentals of modern uv-visible spectroscopy**. Germany: Agilent Technologies, 2000. 148 p.

ÖZKAN, G.; SAGDIÇ, O.; BAYDAR, N.G.; KURUMAHMUTOGLU, Z. Antibacterial activities and total phenolic contents of grape pomace extracts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, p. 1807–1811, Aug., 2004.

PESCHEL, W.; SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W.; PLESCHER, A.; GARTZÍA, I.; JIMÉNEZ, D.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.; BUXADERAS, S.; CODINA, C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, Barking, v. 97, p. 137-150, July, 2006.

PODSEDEK, A.; SOSNOWSKA, D.; ANDERS, B. Antioxidative capacity of tomato products. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 217, p. 296–300, Oct., 2003.

POMMER, C.V.; MURAKAMI, K.R.N.; WATLINGTON, F. Goiaba no mundo. **O Agrônômico**, Campinas, v. 58, n. 1/2, p. 22-26, 2006.

PRABU, G.R.; GNANAMAMI, A.; SADULLA, S. Guaijaverin – a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 101, p. 487–495, May, 2006.

PRADO, A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. 2009. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

PRASAD, N.B.L.; AZEEMODDIN, G. Characteristics and composition of guava (*Psidium guajava* L.) seed and oil. JNTU:Oil Technological Research Institute, **Journal of the American Oil Chemists’ Society**, Chicago, v. 71, n. 4, p. 457-458, Apr., 1994.

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**, Easton, v. 53, p. 4290-4302, May, 2005.

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

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

REISCHE, D.W.; LILLARD, D.A.; EITENMILLER, R.R. Antioxidants. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**, 2 th ed., New York: Marcel Dekker, 2002, 1005 p.

ROCKENBACH, I.I.; SILVA, G.L.; RODRIGUES, E.; KUKOSKI, 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 *Anceleta*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 238-244, dez., 2008.

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

RUBILAR, M.; PINELO, M.; SHENE, C.; SINEIRO, J.; NUÑEZ, M. J. Separation and HPLC-MS identification of phenolic antioxidants from agricultural residues: almond hulls and grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, p. 10101–10109, Nov., 2007.

RUPASINGHE, H.P.V.; CLEGG, S. Total antioxidant capacity, total phenolic content, mineral elements, and histamine concentrations in wines of different fruit sources. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, p. 133–137, Mar., 2007.

SALIB, J.Y.; MICHAEL, H.N. Cytotoxic phenylethanol glycosides from *Psidium guajava* seeds. **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, p. 2091–2093, July, 2004.

SANTOS, M.S. **Cervejas e refrigerantes**. São Paulo: CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, 2005. 58 p.

SCHIEBER, A.; STINTZING, F.C.; CARLE, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 12, p. 401–413, Nov., 2001.

SHOKO T.; SOICHI T.; MEGUMI, M.M.; ERI F.; JUN K.; MICHIKO, W. Isolation and identification of an antibacterial compound from grape and its application to foods. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, Tokyo, v. 73, p. 125–128, 1999.

SILVA, L.M.L.R. Caracterização dos subprodutos da vinificação. **Millenium**, Viseu, v. 28, p. 123-133, out., 2003.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, New York, v. 299, p. 152–178, 1999.

SOCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, p. 205-218, Mar., 2003.

STALIKAS, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3268-3295, Dec., 2007.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. SAS 9.0. Cary:SAS Institute, 2002.

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

THIMOTHE, J.; BONSI, I.A.; PADILLA-ZAKOUR, O.I.; KOO, H. Chemical characterization of red wine grape (*Vitis vinifera* and *Vitis* interspecific hybrids) and pomace phenolic extracts and their biological activity against *Streptococcus mutans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, p. 10200–10207, Nov., 2007.

TORRES, J. L.; BOBET, R. New flavanol derivatives from grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant aminoethylthio-flavan-3-ol conjugates from a polymeric waste fraction used as a source of flavanols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 4627-4634, Sept., 2001.

VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; TRONCOSO, A.M.; GARCIA-PARRILA, M.C. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites *in vitro*. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 538, p. 391-398, May, 2005.

YI, C.; SHI, J.; KRAMER, J.; XUE, S.; JIANG, Y.; ZHANG, M.; MA, Y.; POHORLY, J. Fatty acid composition and phenolic antioxidants of winemaking pomace powder. **Food Chemistry**, Barking, v. 114, p. 570–576, May, 2009.

ZHAO, Z.; MOGHADASIAN, M.H. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: a review. **Food Chemistry**, Barking, v. 109, p. 691-702, Aug., 2008.