

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA ISABEL SIMCZAK VEDANA

EFEITO DO PROCESSAMENTO NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA UVA

CURITIBA
2008

MARIA ISABEL SIMCZAK VEDANA

EFEITO DO PROCESSAMENTO NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA UVA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Tecnologia de Alimentos do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos do Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr^a. Lys Mary Bileski
Cândido

Co-orientador: Prof. Dr. Obdúlio Gomes
Miguel

CURITIBA
2008

Vedana, Maria Isabel Simczak

Efeito do processamento na atividade antioxidante da uva / Maria Isabel Simczak Vedana. – Curitiba, 2008.
85 f. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Lys Mary Bileski Cândido.

Co-orientador: Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos.

Inclui Bibliografia.

1. Uva – Processamento. 2. Antioxidantes.

I. Cândido, Lys Mary Bileski. II. Miguel, Obdúlio Gomes. III. Título.
IV. Universidade Federal do Paraná.

CDD 664.8048

MARIA ISABEL SIMCZAK VEDANA

**EFEITO DO PROCESSAMENTO NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
DA UVA**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. LYS MARY BILESKI CÂNDIDO
Setor de Ciências da Saúde, UFPR



Prof^ª. Dr^ª. CLÁUDIA CARNEIRO HECKE KRÜGER
Setor de Ciências da Saúde, UFPR



Dr^ª. SÔNIA CACHOEIRA STERTZ
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 22 de agosto de 2008

As pessoas que amo e que estão sempre ao meu lado, em especial, aos meus pais, meus irmãos e meu marido.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e pela oportunidade de estar convivendo com pessoas tão especiais. Por iluminar minha vida, meus caminhos e minhas escolhas.

Aos meus pais, Univaldo e Angela Maria pelo amor incondicional, pela ótima educação, por sempre me apoiarem e por terem formado uma família tão linda e unida.

Aos meus irmãos Miguel Angelo e Julio Cesar por existirem e me ajudarem a crescer e ser uma pessoa melhor a cada dia.

Ao meu marido lindo, Turene, por me escolher para estar ao seu lado, pela paciência e apoio nos momentos estressantes e pela felicidade que é sua companhia.

A professora Lys Mary, por acreditar em mim desde a graduação, pelas palavras carinhosas quando o desânimo aparecia e pelos finais de semana que dedicou a esse trabalho e a mim.

Ao professor Obdúlio por estar sempre disposto a ajudar e explicar com uma calma admirável.

Aos técnicos Lindamir e Jair, por serem mais que técnicos, serem companheiros e amigos.

As alunas de iniciação científica, Celine, Cris Ziemer, Cris Lima e Luciana que me ajudaram nas análises e fizeram os momentos nos laboratórios mais divertidos.

A Joy pela companhia constante no aprendizado da técnica do DPPH e ABTS.

Aos colegas que conheci na Pós-Graduação, Marcelo e Anne Caroline, por serem um motivo a mais para ir às aulas e a Elizabete pela disposição e apoio constante.

A Andréa pela companhia, apoio e amizade desde a graduação.

A todos os professores, funcionários e colegas que de alguma forma me ensinaram algo e contribuíram para a realização desse trabalho.

As minhas amigas, Pola, Geu e Clau, por mesmo distantes me darem tanta força e me fazerem tão bem.

A todas as boas energias que recebi e que me ajudaram a concluir este trabalho.

A Felicidade não é algo que se busca, mas algo que se tem. É necessário ver a vida de outra forma e valorizar as pequenas conquistas, os pequenos prazeres.

(Maria Isabel Vedana)

RESUMO

As vitaminas C, E e os flavonóides são considerados excelentes antioxidantes, capazes de interagir com espécies reativas de oxigênio com grande eficiência. Vários são os métodos para testar a atividade antioxidante, podendo ser usados para compostos isolados e extratos. Diversos estudos têm demonstrado que a uva é fonte natural de antioxidantes e rica em compostos fenólicos, mas muito pouco estudada quanto ao efeito do seu processamento nesses compostos. O objetivo desse trabalho foi a determinação do efeito do processamento na atividade antioxidante de uva. Como objetivos secundários foram incluídos: comparação da capacidade antioxidante de extratos elaborados a partir de uva da cultivar Isabel e de dois produtos dessa fruta elaborados em laboratório: o suco e a geléia, produtos de grande consumo na população, assim como correlacionar com a quantidade de fenólicos totais e de antocianinas totais. Comparar também a atividade antioxidante do suco elaborado com sucos comerciais. Os métodos empregados foram: radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS). A extração hidroalcoólica favoreceu a extração dos compostos fenólicos e a elevada atividade antioxidante, mas a utilização de altas temperaturas provocou a destruição de grande parte das antocianinas. O extrato hidroalcoólico a quente apresentou atividade antioxidante superior para o método do DPPH e o extrato hidroalcoólico a frio para o método ABTS. O extrato aquoso apresentou a atividade antioxidante inferior nos dois métodos empregados. O suco preparado em laboratório apresentou elevada atividade antioxidante em comparação aos sucos comerciais, apresentando-se abaixo apenas de um suco concentrado que tinha como aditivo um composto utilizado também como antioxidante. Obteve-se boa correlação ($R^2 = 0,8203$) entre os métodos utilizados para determinação da atividade antioxidante, DPPH e ABTS. O processamento diminuiu a capacidade antioxidante da uva, chegando a 60% e 51% para o suco e a geléia respectivamente. A quantidade de fenólicos totais teve uma redução de 66% no processamento do suco e 68% no processamento da geléia. A perda mais expressiva ocorreu com as antocianinas totais, sendo 71% e 92% no processamento do suco e da geléia respectivamente.

Palavras-chave: Uva. Antioxidantes. DPPH. ABTS. Compostos fenólicos. Antocianinas.

ABSTRACT

The vitamins C and E, as well as the flavonoids, are known to have excellent antioxidant properties, taking up free radicals very efficiently. Several methods are used to test antioxidant activity, either in extracts or isolate compounds. Many studies have shown that grapes are a natural source of antioxidants and rich in phenolic compounds, although little is known regarding the effects of processing on such compounds. The objective of this study was to determine the effect of processing the antioxidant activity of grape. Other aims included: compare the antioxidant capacity of extracts of grapes of the cultivar Isabel, as well as in two laboratory-made products: juice and jelly, both commonly consumed by the people. The amount of anthocyanins and phenolic compounds were also determined and correlated. The antioxidant capacity of the prepared grape juice was also compared to commercial grape juices. Grape extracts, juice and jam were assessed for their antioxidant capacity by both the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method and the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzotiazole-6-sulfonic acid (ABTS) method. The hydroalcoholic method of extraction has proven more efficient than the aqueous method in extracting phenolic compounds from samples. Although, when extraction was carried out under high temperatures, a considerable amount of the grape anthocyanins was destroyed. The hydroalcoholic extract obtained under heating presented higher antioxidant capacity when the free radical DPPH method was used. On the other hand, the cold hydroalcoholic extract presented higher antioxidant capacity when the ABTS method was used. The aqueous extract presented lower antioxidant capacity than the hydroalcoholic extract to both of the methods used. The antioxidant capacity of the prepared juice was higher than that of commercial grape juices, excepting from one of them that was added with an antioxidant additive. A very strong correlation ($R_2 = 0,8203$) was observed between results from the two methods used for measuring antioxidant capacity, namely the free radical DPPH and the ABTS methods. The processing decreased the antioxidant capacity of grape, reaching 60% and 51% for juice and jelly respectively. The amount of phenolic compounds had a 66% reduction in the processing of juice and 68% in the processing of jelly. The most significant decline occurred with the total anthocyanins, with 71% and 92% in the processing of juice and jelly respectively.

Key words: Grape. Antioxidant. Fenolic compounds. Anthocyanines. DPPH. ABTS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	– EXTRATOR UTILIZADO NA ELABORAÇÃO DO SUCO DE UVA.....	38
FIGURA 2	– CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DOSAGEM DE FENÓLICOS TOTAIS.....	44
GRÁFICO 1	– DETERMINAÇÃO DOS FENÓLICOS TOTAIS NO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A FRIO.....	45
GRÁFICO 2	– DETERMINAÇÃO DOS FENÓLICOS TOTAIS NO EXTRATO AQUOSO.....	45.
GRÁFICO 3	– DETERMINAÇÃO DOS FENÓLICOS TOTAIS NO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A QUENTE.....	46
GRÁFICO 4	– DETERMINAÇÃO DOS FENÓLICOS TOTAIS NA GELÉIA.....	46
GRÁFICO 5	– DETERMINAÇÃO DOS FENÓLICOS TOTAIS NO SUCO DE UVA....	46
FIGURA 3	– ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A FRIO AVALIDADO PELO MÉTODO DO DPPH.....	50
GRÁFICO 6	– CURVA CINÉTICA DA REDUÇÃO DO DPPH DE DIFERENTES SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	51
GRÁFICO 7	– COMPORTAMENTO CINÉTICO DO EXTRATO AQUOSO COM TEMPO DE REAÇÃO DE UMA E 24 HORAS NA METODOLOGIA DO DPPH.....	52
GRÁFICO 8	– COMPORTAMENTO CINÉTICO DO TROLOX COM TEMPO DE REAÇÃO DE UMA E 24 HORAS NA METODOLOGIA DO DPPH.....	52
GRÁFICO 9	– COMPORTAMENTO CINÉTICO DO ÁCIDO ASCÓRBICO COM TEMPO DE REAÇÃO DE UMA E 24 HORAS NA METODOLOGIA DO DPPH.....	52
GRÁFICO 10	– EQUAÇÃO DE RETA DO TROLOX EM REAÇÃO COM O DPPH.....	53
GRÁFICO 11	– EQUAÇÃO DE RETA DO ÁCIDO ASCÓRBICO EM REAÇÃO COM O DPPH.....	54
GRÁFICO 12	– COMPORTAMENTO CINÉTICO DO EXTRATO AQUOSO UTILIZANDO A METODOLOGIA DO DPPH.....	54
GRÁFICO 13	– COMPORTAMENTO CINÉTICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A FRIO UTILIZANDO A METODOLOGIA DO DPPH.....	55
GRÁFICO 14	– COMPORTAMENTO CINÉTICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A QUENTE NA METODOLOGIA DO DPPH.....	55

GRÁFICO 15 – COMPORTAMENTO CINÉTICO DA GELÉIA DE UVA UTILIZANDO A METODOLOGIA DO DPPH.....	55
GRÁFICO 16 – COMPORTAMENTO CINÉTICO DO SUCO DE UVA UTILIZANDO A METODOLOGIA DO DPPH.....	56
FIGURA 4 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A FRIO PELO MÉTODO ABTS.....	56
GRÁFICO 17 – EQUAÇÃO DE RETA ESTABELECIDADA PARA O CÁLCULO DO EC ₅₀ E TEAC PELO MÉTODO ABTS.....	57
GRÁFICO 18 – EQUAÇÃO DE RETA ESTABELECIDADA PARA O CÁLCULO DO EC ₅₀ E VCEAC PELO MÉTODO ABTS.....	57
GRÁFICO 19 – COMPORTAMENTO CINÉTICO DO EXTRATO AQUOSO UTILIZANDO A METODOLOGIA DO ABTS.....	58
GRÁFICO 20 – COMPORTAMENTO CINÉTICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A FRIO UTILIZANDO A METODOLOGIA DO ABTS.....	58
GRÁFICO 21 – COMPORTAMENTO CINÉTICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A QUENTE UTILIZANDO A METODOLOGIA DO ABTS.....	58
GRÁFICO 22 – COMPORTAMENTO CINÉTICO DA GELÉIA DE UVA UTILIZANDO A METODOLOGIA DO ABTS.....	59
GRÁFICO 23 – COMPORTAMENTO CINÉTICO DO SUCO DE UVA UTILIZANDO A METODOLOGIA DO ABTS.....	59
GRÁFICO 24 – COMPARAÇÃO DE EXTRAÇÃO DE CADA ETAPA DO EXTRATO AQUOSO UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS.....	63
GRÁFICO 25 –COMPARAÇÃO DE EXTRAÇÃO EM CADA ETAPA DO EXTRATO AQUOSO UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS.....	64
GRÁFICO 26 – COMPARAÇÃO DOS VALORES DE TEAC DE CADA ETAPA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A FRIO UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS.....	65
GRÁFICO 27 – COMPARAÇÃO DE CADA ETAPA EXTRAÇÃO DE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A FRIO UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS.....	66
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA NO UV PRESENTES NO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA UVA.....	70
FIGURA 6 – FINGERPRINT DOS COMPOSTOS PRESENTES NO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA UVA.....	71

FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA DO
COMPOSTO PRESENTE EM MAIOR CONCENTRAÇÃO NO
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA UVA..... 71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PRODUÇÃO DE UVAS, VINHOS E DERIVADOS NO BRASIL, NOS ANOS DE 2003 A 2007.....	20
TABELA 2 – CONCENTRAÇÕES DOS SOLVENTES EMPREGADOS DE ACORDO COM O TEMPO.....	42
TABELA 3 – DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS E ANTOCIANINAS TOTAIS DOS EXTRATOS E PRODUTOS ELABORADOS.....	47
TABELA 4 – VALORES DE TEAC UTILIZANDO O MÉTODO DPPH E ABTS PARA OS EXTRATOS E PRODUTOS ELABORADOS.....	60
TABELA 5 – VALORES DE VCEAC UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS PARA OS EXTRATOS E PRODUTOS ELABORADOS.....	61
TABELA 6 – COMPARAÇÃO DO TEAC DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS.....	63
TABELA 7 – COMPARAÇÃO DO VCEAC DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS.....	64
TABELA 8 – COMPARAÇÃO DO TEAC DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A FRIO UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS.....	64
TABELA 9 – COMPARAÇÃO DO VCEAC DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A FRIO UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS.....	65
TABELA 10 – COMPARAÇÃO DO TEAC DO SUCO ELABORADO NO LABORATÓRIO COM OS SUCOS COMERCIAIS UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS.....	67
TABELA 11 – COMPARAÇÃO DO VCEAC DO SUCO ELABORADO NO LABORATÓRIO COM OS SUCOS COMERCIAIS UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS.....	68
TABELA 12 – COMPARAÇÃO DO VCEAC DO SUCO ELABORADO NO LABORATÓRIO COM OS SUCOS COMERCIAIS UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS.....	69
TABELA 13 – COMPARAÇÃO DOS VALORES DE VCEAC DOS MESES DE ARMAZENAMENTO DO SUCO ELABORADO NO LABORATÓRIO UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS.....	69
TABELA 14 – CÁLCULO DO QUADRADO MÉDIO DOS FENÓLICOS TOTAIS E ANTOCIANINAS TOTAIS DOS EXTRATOS E PRODUTOS	

ELABORADOS.....	86
TABELA 15 – CÁLCULO DO QUADRADO MÉDIO DOS VALORES DE TEAC DOS EXTRATOS E PRODUTOS ELABORADOS.....	86
TABELA 16 – CÁLCULO DO QUADRADO MÉDIO DOS VALORES DE TEAC DOS EXTRATOS E PRODUTOS ELABORADOS.....	86
TABELA 17 – CÁLCULO DO QUADRADO MÉDIO DOS VALORES DE TEAC DAS EXTRAÇÕES DO EXTRATO AQUOSO.....	86
TABELA 18 – CÁLCULO DO QUADRADO MÉDIO DOS VALORES DE VCEAC DAS EXTRAÇÕES DO EXTRATO AQUOSO.....	87
TABELA 19 – CÁLCULO DO QUADRADO MÉDIO DOS VALORES DE TEAC DAS EXTRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A FRIO.....	87
TABELA 20 – CÁLCULO DO QUADRADO MÉDIO DOS VALORES DE VCEAC DAS EXTRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A FRIO.....	87
TABELA 21 – CÁLCULO DO QUADRADO MÉDIO DOS VALORES DE TEAC DOS SUCOS COMERCIAIS E DE LABORATÓRIO.....	87
TABELA 22 – CÁLCULO DO QUADRADO MÉDIO DOS VALORES DE TEAC DOS SUCOS COMERCIAIS E DE LABORATÓRIO.....	88
TABELA 23 – CÁLCULO DO QUADRADO MÉDIO DOS VALORES DE TEAC DOS MESES DE ARMAZENAMENTO DO SUCO ELABORADO EM LABORATÓRIO UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS.....	88
TABELA 24 – CÁLCULO DO QUADRADO MÉDIO DOS VALORES DE VCEAC DOS MESES DE ARMAZENAMENTO DO SUCO ELABORADO NO LABORATÓRIO UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	- Por cento
µg	- micrograma
µl	- microlitro
µm	- micrometro
µmol	- micromol
α	- Alfa
ABTS	- ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
β	- Beta
BHA	- Butil-hidroxi-anisol
°C	- Graus Celsius
CLAE	- Cromatografia Líquida de alta eficiência
CO ₂	- Dióxido de carbono
cv	- Cultivar
DPPH	- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EC ₅₀	- Concentração mínima da substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH ou ABTS
EROs	- Espécies Reativas de Oxigênio
FD	- Fase diluente
g	- Gramas
H ₂ O ₂	- Peróxido de Hidrogênio
HAF	- Hidroalcoólico a frio
HAQ	- Hidroalcoólico a quente
LDL	- lipoproteína de baixa-densidade
M	- Molar
mg	- miligramas
mM	- milimolar
nm	- nanômetro
¹ O ₂	- Oxigênio singlete
O ₂ ^{•-}	- Radical superóxido
OH [•]	- Radical hidroxil
RO [•]	- Alcoxila
ROO [•]	- Peroxila
TEAC	- Capacidade antioxidante equivalente ao trolox
trolox	- ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico 97%
V.	- <i>Vitis</i>
VCEAC	- Atividade antioxidante equivalente a vitamina C

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 OBJETIVOS.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 UVA.....	20
2.1.1 Suco.....	22
2.1.2 Geléia.....	23
2.2 OXIDAÇÃO E RADICAIS LIVRES.....	24
2.3 ANTIOXIDANTES.....	26
2.3.1 Compostos fenólicos.....	27
2.3.1.1 Antocianinas.....	29
2.4 EXTRAÇÃO.....	31
2.5 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS.....	32
2.6 DETERMINAÇÃO DAS ANTOCIANINAS TOTAIS.....	32
2.7 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	33
2.7.1 DPPH.....	34
2.7.2 ABTS.....	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS.....	37
3.1.1 Uvas.....	37
3.1.2 Sucos comerciais.....	37
3.2 PADRÕES.....	37
3.2.1 Fenólicos totais.....	37
3.2.2 Análise da capacidade antioxidante.....	37
3.3 EQUIPAMENTOS.....	38
3.4 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	38
3.4.1 Preparo do suco em laboratório.....	38
3.4.2 Preparo da geléia em laboratório.....	39
3.4.3 Preparo dos extratos.....	39
3.5 MÉTODOS.....	40
3.5.1 Determinação de fenólicos totais.....	40
3.5.2 Determinação de antocianinas totais.....	40
3.5.3 Determinação da capacidade antioxidante.....	41
3.5.3.1 Método DPPH.....	41

3.5.3.2 Método ABTS.....	41
3.5.4 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	42
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1 FENÓLICOS TOTAIS E ANTOCIANINAS TOTAIS.....	44
4.2 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	50
4.2.1 Método DPPH.....	50
4.2.2 Método ABTS.....	56
4.2.3 TEAC e VCEAC.....	59
4.2.3.1 Efeito dos processos de extração.....	72
4.2.3.2 Sucos comerciais.....	66
4.2.3.3 Armazenamento suco.....	68
4.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	70
5 CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS.....	74
APÊNDICE.....	85

1 INTRODUÇÃO

Os antioxidantes estão sendo muito estudados por se associarem à redução de risco de muitas doenças. Busca-se cada vez mais o consumo de alimentos que tragam benefícios a saúde e os compostos antioxidantes são muito estudados exatamente pelos seus benefícios ao organismo. Por isso a importância de estudar os alimentos e conhecer sua capacidade antioxidante.

O envelhecimento da célula, dos tecidos e do organismo como um todo, é uma ação dos radicais livres, os seus efeitos sobre o organismo são, de uma maneira geral, nocivos e estão relacionados há cerca de 60 condições clínicas, entre elas a catarata, a aterosclerose, o câncer, isquemia, alterações no sistema nervoso, entre outras (LANGSETH, 1995).

Em decorrência da eficiência parcial do sistema antioxidante endógeno do organismo humano, torna-se necessária a contribuição de antioxidantes exógenos, obtidos através da dieta (PIETTA; SIMONETTI; MAURI, 1998).

Os alimentos, principalmente as frutas, verduras e legumes, contêm agentes antioxidantes, como as vitaminas C, E e A, a clorofilina, os flavonóides, carotenóides, curcumina e outros que são capazes de restringir a propagação das reações em cadeia e as lesões induzidas pelos radicais livres (STAVRIC, 1994; FOTSIS *et al.*, 1997; POOL-ZOBEL *et al.*, 1997).

Os compostos fenólicos exibem grande quantidade de propriedades fisiológicas (como antialérgica, antiaterogênica, antiinflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotetiva e vasodilatadora), mas o principal efeito dos compostos fenólicos tem sido atribuído à sua ação antioxidante em alimentos (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Segundo Kim, Jeong e Lee (2003), os compostos fenólicos, presentes nas frutas e hortaliças, são um dos principais responsáveis pela atividade antioxidante destas.

As uvas são consideradas uma das maiores fontes de compostos fenólicos quando comparadas a outras frutas e vegetais (MAXCHEIX, 2000). É também uma fruta muito consumida no mundo, tanto na forma *in natura* ou processada como vinhos, sucos, doces ou geléias e muito associada à atividade antioxidante.

Tem sido demonstrado que a ingestão de compostos que tenham atividade antioxidante é muito importante, e vários métodos químicos, biológicos e

eletroquímicos têm sido propostos para avaliar o poder antioxidante de compostos como os polifenóis (BRENNA; PAGLIARINI, 2001).

A determinação da capacidade antioxidante de uma amostra pode depender da tecnologia e do radical livre gerador ou oxidante utilizado nesta medida. Além disso, a comparação de diferentes métodos analíticos constitui um fator chave para ajudar os pesquisadores a escolher um método e entender os resultados obtidos através do mesmo (CAO; PRIOR, 1998).

O consumo cada vez mais freqüente de alimentos industrializados desperta o interesse na qualidade desses produtos que estão sendo consumidos e a influência do processamento ainda é pouco estudada. Por isso a importância em verificar a influência desse processamento nos compostos benéficos que estão presentes nos alimentos *in natura*. Neste trabalho pretende-se verificar de que forma está sendo influenciada a atividade antioxidante da uva na elaboração do suco e da geléia.

1.1 OBJETIVOS

Objetivo Principal

Determinar o efeito do processamento na atividade antioxidante de uva

Objetivos Secundários

Determinar a quantidade de fenólicos totais da uva e do suco e geléia elaborada;

Determinar a quantidade de antocianinas totais da uva e do suco e geléia preparada a partir da fruta;

Determinar a atividade antioxidante da uva e dos seus subprodutos feitos em laboratório;

Comparar as atividades antioxidantes da fruta e dos produtos elaborados;

Comparar a atividade antioxidante do suco elaborado com sucos comerciais;

Comparar os resultados obtidos na determinação dos fenólicos totais, das antocianinas e da atividade antioxidante;

Comparar os resultados obtidos através dos métodos químicos que determinam a capacidade antioxidante, DPPH e ABTS.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 UVA

A cada dia que passa cresce o número de adeptos a ingestão de vinho tinto devido às suas propriedades benéficas a saúde. Na mesma proporção, cresce também o desenvolvimento de produtos alternativos, mas que tragam as mesmas características procuradas nos vinhos. O alvo deste interesse é um grupo de substâncias denominadas polifenóis, entre as quais se encontra o resveratrol, presente em diversas plantas, como eucalipto, amendoim, amoras, e especialmente na uva e seus derivados (HILLIS *et al.*, 1974, LANGCAKE *et al.*, 1979, SOUTO *et al.*, 2001)

No mundo existem mais de 10 mil variedades diferentes de uvas, que se adaptam a diferentes tipos de solo e clima, sendo cultivadas em várias regiões.

As uvas podem ser classificadas em dois grandes grupos:

- De origem européia – *Vitis vinifera* – que se destina principalmente à produção de vinhos finos.
- De origem americana – *Vitis labrusca* – destinada à produção de vinhos, sucos e derivados, entram na categoria das uvas comuns. A alta produção de *V. labrusca* no Brasil (80%) é devida às suas características de rusticidade ao clima e alta produção de mosto (ALVES, 2006).

A produção no Brasil entre 2003 e 2007 de uvas, vinhos e derivados pode ser verificada na tabela 1.

TABELA 1 – PRODUÇÃO DE UVAS, VINHOS E DERIVADOS NO BRASIL, NOS ANOS DE 2003 A 2007

PRODUTOS/ANOS	2003	2004	2005	2006	2007
Uvas Viníferas	43.367.979	62.593.792	70.609.245	56.596.447	72.151.978
Uvas Comuns	339.744.071	516.396.102	422.637.749	367.039.121	498.383.918
Total Uvas (em kg)	383.112.050	578.989.894	493.246.994	423.635.568	570.535.896
Vinhos Viníferas	23.918.885	42.902.608	45.496.898	32.193.976	43.176.484
Vinhos Comuns	179.280.945	313.962.284	226.037.432	185.075.887	275.287.909
Total Vinhos (L)	203.199.830	356.864.892	271.534.330	217.269.863	318.464.393
Derivados	29.156.088	51.923.276	53.502.201	59.512.689	70.890.923
Total de Vinhos e Derivados (L)	232.355.918	408.788.168	325.036.531	276.782.552	389.355.316

Fonte: UVIBRA, 2008.

Em 2007, de acordo com a União Brasileira de Viticultura (UVIBRA), o Brasil produziu aproximadamente 498 milhões de quilos de uvas comuns, um aumento de 18% em relação à produção de 2005 e de quase 36% à de 2006. Deste total, aproximadamente 55,2% destinou-se a produção de vinhos, 30,6% foi consumida “*in natura*” e 14,2% resultou em sucos, geléias e outros derivados.

A cultivar Isabel, de origem americana, é também chamada de “Isabella”, “Brasileira”, “Nacional” e “Frutilla” (no Uruguai), e é tida como híbrido natural de *V. labrusca* X *V. vinífera* (ALVES, 2006).

Apresenta sabor característico das labruscas, adaptando-se a todos os usos: é consumida como uva de mesa, utilizada para elaboração de vinhos brancos, rosados e tintos, doces, secos e licorosos, espumantes, vinhos compostos, origina suco de boa qualidade, sendo a base do suco brasileiro para exportação. Além disso, pode servir de matéria prima para doces e geléias. (LEÃO; SOARES, 2000).

Apresenta cachos de tamanho médio, bagas arredondadas, de cor preta, recobertas de pruína, polpa sucosa e doce (LEÃO; SOARES, 2000).

Como característica geral da variedade labrusca, a Isabel apresenta elevado teor de antranilato de metila, substância que produz aroma forte de uva, sendo esse tipo de aroma conhecido por “foxado”, ou próprio da *Fox grape*, espécie norte-americana que deu origem a Isabel (CAMARGO, 2003). Devido a esse aroma, ela mascara a percepção de aromas refinados do vinho, seu uso é limitado para elaboração de vinhos finos. Esta variedade é amplamente utilizada para elaboração de vinhos de mesa comuns, que, devido às suas características típicas, devem ser consumidos jovens, pois não melhoram com o envelhecimento (RIZZON; MIELE; MENEGUZZO, 2000).

O vinho obtido a partir das cultivares americanas destina-se exclusivamente ao mercado nacional de vinhos populares, enquanto o suco de uva produzido destas mesmas cultivares dão origem a um produto típico com ótimas características organolépticas, além da relação equilibrada entre açúcares/acidez, necessárias à elaboração de um produto com alta qualidade (ALVARENGA; ABRAHÃO, 1984; RIZZON; MANROI; MENEGUZZO, 1998; SILVA, 1998).

As uvas são consideradas uma das maiores fontes de compostos fenólicos quando comparadas a outras frutas e vegetais (MAXCHEIX; FLEURIET; BILLOT, 1990). A grande diversidade entre as cultivares resulta em uvas com diferentes características, tanto de sabor quanto de coloração, o que certamente está

associado com o conteúdo e o perfil dos polifenólicos. Por ser a matéria-prima para a produção de vinhos e sucos, é importante conhecer os teores de compostos fenólicos das uvas, pois estes podem influenciar a qualidade dos produtos finais (ABE *et al.*, 2007).

Os subprodutos do suco de uva e da produção de vinho também são fontes de várias combinações de fenólicos que despertam muito interesse devido a suas propriedades antioxidantes e seus efeitos benéficos para a saúde humana (SHRIKHANDE, 2000; TORRES; BOBET, 2001).

Dados da literatura sobre o conteúdo de compostos fenólicos em extratos e em geléias de uvas apresentam diferenças significativas. A influência do processamento, assim como a variedade de uva, e as condições climáticas e atmosféricas do local de cultivo podem influenciar no conteúdo destes compostos e, conseqüentemente, nas propriedades antioxidantes (AMAKURA, 2000; KIRALP; TOPPARE, 2006).

2.1.1 Suco

Segundo Aquarone e colaboradores (2001), o suco de uva apresenta em sua composição química elevado teor de açúcar, glicose e frutose, sendo considerado, por isso, um alimento energético. Os açúcares presentes na uva variam de 15 a 30% em função de vários fatores como o clima, solo, estágio de maturação e variedade, tendo no início da maturação, a glicose com predominância. No período de maturação das bagas ocorre a concentração de açúcar, formada através de reserva da planta e sintetizada nas folhas pela ação da luz solar (POMMER, 2003).

De acordo com Peynaud (1997) e Usseglio-Tomasset (1995), a acidez do suco é conseqüência da presença dos ácidos tartárico, málico e cítrico, variando em função das condições edafoclimáticas, da cultivar utilizada e dos métodos de cultivo adotado durante o desenvolvimento. São esses ácidos orgânicos que lhe conferem um pH baixo, garantindo um equilíbrio entre os gostos doce e ácido (SANTANA *et al.*, 2008).

2.1.2 Geléia

Geléia de fruta é o produto obtido pela cocção de frutas inteiras ou em pedaços, polpa ou suco de frutas, com açúcar e água e concentrado até consistência gelatinosa. O produto deve ser preparado de frutas sãs, limpas, isentas de matéria terrosa, de parasitos, de detritos, de animais ou vegetais, e de fermentação. Poderá ser adicionado de glicose ou açúcar invertido. Não pode ser colorido e nem aromatizado artificialmente. É tolerada a adição de acidulantes e de pectina para compensar qualquer deficiência no conteúdo natural de pectina ou de acidez da fruta, de acordo com a Resolução nº 12, de 1978 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos.

Para obtenção de uma geléia de boa qualidade, três componentes são indispensáveis: açúcar, ácido e pectina (ALVES, 2006).

A pectina é considerada um colóide hidrófilo com carga negativa, que é estabilizada por uma camada de água que envolve cada micélio. A formação da geléia se dá, de acordo com essa hipótese, quando ocorre a precipitação da pectina, ramificando os aglomerados de micélio na presença de açúcar, que atua como um agente desidratante, e na presença de íons de hidrogênio, que agem para reduzir a carga negativa sobre a pectina. A pectina aglutina-se na forma de uma rede de fibras não solúveis (ALVES, 2006). Segundo Salunkhe e Kadam (1995), uvas viníferas possuem menores quantidades de pectina quando comparadas com uvas das variedades americanas, por essa razão as uvas americanas formam geléias estáveis.

As frutas podem ser classificadas de acordo com a quantidade de pectina e ácido que possuem. Das frutas ricas em pectina e ácidos podemos citar variedades ácidas de maçãs de mesa, amoras pretas ácidas, limões, variedades ácidas de laranja, goiabas ácidas e uvas da variedade labrusca. Entre as que apresentam concentração moderada de ácido e pectina estão as uvas maduras da variedade vinífera, amoras pretas maduras e maçãs maduras (CRUESS, 1973).

2.2 OXIDAÇÃO E RADICAIS LIVRES

Sabe-se que os seres humanos dependem da oxidação biológica como fonte de energia para a sobrevivência e atividade, contudo, a ação do oxigênio é ambígua. As espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH^{\cdot}) podem causar danos funcionais ao homem, apesar de serem constantemente formadas no corpo humano (HAMID *et al.*, 2002).

As moléculas orgânicas, inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres (HALLIWELL, 1994). Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas. A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (POMPELLA, 1997).

As EROs são as várias formas de oxigênio ativado, singlete (1O_2), entre as quais se incluem os denominados radicais livres. Os termos, radical livre, agente oxidante, espécie radicalar, espécie ativada e espécie reativa são freqüentemente utilizados para designar, de forma genérica, todas as espécies reativas do oxigênio de importância biológica e que podem ser definidas como qualquer espécie química capaz de existir independentemente de outras espécies e que possui um ou mais elétrons não pareados (RAYMUNDO, 2003; SOARES, 2002).

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (ANDERSON, 1996; YU; ANDERSON, 1997).

O envelhecimento da célula, dos tecidos e do organismo como um todo, é uma ação destes radicais livres, que por possuírem um elétron livre na última camada são muito instáveis, reativos. Para se estabilizar eles podem ganhar um elétron (reação de redução) ou perder um elétron (reação de oxidação). Os seus efeitos sobre o organismo são, de uma maneira geral, nocivos e estão relacionados há cerca de 60 condições clínicas, entre elas a catarata, a aterosclerose, o câncer e doenças cardiovasculares, alterações no sistema nervoso, entre outras (LANGSETH, 1995).

O papel das reações dos radicais livres nas doenças humanas, biologia, toxicologia, e na deterioração de alimentos tornou-se uma área de intenso interesse. Em destaque, a reação de lipoperoxidação dos radicais livres como um ponto importante na indústria alimentícia, onde a oxidação é minimizada em alimentos contendo lipídios através do uso de antioxidantes durante a industrialização (BAGGIO, 2006).

As EROs podem atuar em sistemas biológicos bem como nos alimentos, uma vez que os ácidos graxos poliinsaturados, constituintes fundamentais das membranas celulares e de diversos tipos de alimentos, principalmente os industrializados, são altamente vulneráveis ao ataque dos radicais livres (RIBEIRO, 2007).

A oxidação no sistema biológico ocorre devido à ação de radicais livres presentes no organismo humano. Estas moléculas possuem um elétron isolado, livre para se ligar a qualquer outro elétron, e por isso são extremamente reativas. As EROs podem ser geradas por fontes endógenas ou exógenas. Por fontes endógenas, originam-se de processos biológicos que normalmente ocorrem no organismo, tais como: redução de flavinas e tióis; resultado da atividade de oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases; presença de metais de transição no interior da célula e de sistemas de transporte de elétrons. Esta geração de radicais livres envolve várias organelas celulares, como mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos, núcleo, retículo endoplasmático e membranas. As fontes exógenas geradoras de radicais livres incluem tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações (SOARES, 2002).

Os radicais do oxigênio tais como alcoxila (RO^{\bullet}), peroxila (ROO^{\bullet}), 1O_2 , dentre outros, são formados nos processos biológicos e causam alterações nas células, agindo diretamente sobre alguns componentes celulares. Desencadeiam reações de oxidação nos ácidos graxos poliinsaturados da membrana lipoprotéica, denominadas de lipoperoxidação, que afetam a integridade estrutural e funcional da membrana celular, alterando sua fluidez e permeabilidade. Tais reações de oxidação estão associadas às doenças degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, queda do sistema imunológico, disfunções cerebrais, catarata, dentre outras, devido aos danos oxidativos que estes provocam no DNA, proteínas e outras

macromoléculas que são acumuladas com a idade (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992; BAGGIO, 2006).

Os danos oxidativos aos tecidos biológicos são modulados por muitos fatores, incluindo a composição do substrato, concentração de oxigênio e pró-oxidantes. Os sistemas biológicos controlam estes fatores oxidativos via diversos mecanismos antioxidantes que restringem a reatividade dos radicais livres. Muitos componentes da dieta, essenciais ou não, podem contribuir para estes sistemas de defesa antioxidantes (DECKER, 1997).

2.3 ANTIOXIDANTES

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos leva ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos (SIES, 1993). Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células.

Uma ampla definição de antioxidante é "qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz" (SIES; STAHL, 1995).

Os mecanismos de atuação dos antioxidantes podem ser diferenciados. Seus efeitos consistem na inativação dos radicais livres, na complexação de íons metálicos ou na redução dos hidroperóxidos para produtos incapazes de formar radicais livres e produtos de decomposição (SHAHIDI; NACZK, 1995).

Em decorrência da eficiência parcial do sistema antioxidante endógeno do organismo humano, torna-se necessária a contribuição de antioxidantes exógenos, obtidos através da dieta (PIETTA; SIMONETTI; MAURI., 1998).

Os antioxidantes presentes nas plantas podem atuar como agentes redutores, seqüestradores de radicais livres, inibidores de enzimas e como quelantes de metais (WANG; LIN, 2000) e a maioria de seus efeitos biologicamente ativos são derivados das funções antioxidantes (VELIOGLU *et al.*, 1998).

Há um interesse crescente em antioxidantes naturalmente encontrados em frutos para uso em fitoterápicos, a fim de substituí-los pelos antioxidantes sintéticos, os quais têm uso restrito devido a seus efeitos colaterais, tais como carcinogenicidade (ITO *et al.*, 1983). Além disso, os antioxidantes naturais possuem

a capacidade de melhorar a qualidade e a estabilidade dos alimentos, agirem como nutracêuticos e proporcionar, ainda, benefícios adicionais à saúde dos consumidores (ARUOMA, 1998; LAI; CHOU; CHAO, 2001).

Os alimentos contêm compostos oxidantes, os quais podem ocorrer naturalmente ou ser introduzidos durante o processamento para o consumo (WATERS *et al.*, 1996). Por outro lado, os alimentos, principalmente as frutas, verduras e legumes, também contêm agentes antioxidantes, tais como as vitaminas C, E e A, a clorofilina, os flavonóides, carotenóides, curcumina e outros que são capazes de restringir a propagação das reações em cadeia e as lesões induzidas pelos radicais livres (STAVRIC, 1994; FOTSIS *et al.*, 1997; POOL-ZOBEL *et al.*, 1997).

Tem sido demonstrado que a ingestão de compostos que tenham atividade antioxidante é muito importante, e vários métodos químicos, biológicos e eletroquímicos têm sido propostos para avaliar o poder antioxidante de compostos como os polifenóis (BRENNAN; PAGLIARINI, 2001).

As vitaminas C, E e o β -caroteno são consideradas excelentes antioxidantes, capazes de seqüestrar os radicais livres com grande eficiência. O uso de medicamentos, o tabagismo, as condições nutricionais, o consumo de álcool, a poluição do ar e outros fatores podem diminuir os níveis de antioxidantes celulares (MACHLIN, 1992; ROE, 1992).

Um grande número de plantas aromáticas e medicinais contém compostos químicos que exibem propriedades antioxidantes, e estes efeitos devem-se principalmente aos compostos fenólicos, tais como flavonóides, ácidos fenólicos e diterpenos fenólicos (MILIAUSKAS *et al.*, 2004). Encontram-se ainda nas frutas, nos vegetais e condimentos outras classes de substâncias que também contribuem para suas propriedades biológicas, como os compostos nitrogenados, carotenóides, vitaminas, polissacarídeos e clorofila (PIMENTEL *et al.*, 2005).

O ácido ascórbico é muito usado como antioxidante natural em uma variedade de produtos, assim como na indústria de alimentos (LARSON, 1997).

2.3.1 Compostos fenólicos

Denominam-se como flavonóides as várias classes de substâncias naturais que contém dois anéis aromáticos unidos por uma cadeia de três átomos de

carbono, que se encontram amplamente distribuídos no reino vegetal com diversas propriedades farmacológicas (HUTCHINGS, 1994).

Para Bitsch (1996), a maioria das substâncias fenólicas pode ser classificada em dois principais grupos: os ácidos carboxílicos fenólicos e os flavonóides, sendo os flavonóides derivados do 2-fenil-benzopireno e classificados como o grupo mais importante. Os principais subgrupos são as catequinas e proantocianidinas, as antocianidinas e os flavonóis ou flavonas (HERRMANN, 1994). O reconhecimento dos benefícios à saúde, por parte das catequinas e proantocianidinas, levou ao uso de extratos de semente de uva como suplementação alimentar (LAPARRA; MICHAUD; MASQUELIER, 1979).

De acordo com Rice-Evans et al. (1996), as propriedades químicas dos polifenóis, relativas à capacidade dos hidrogênios de fenólicos em seqüestrar radicais livres, mostram sua atividade antioxidante. Para esses compostos serem definidos como antioxidantes devem satisfazer duas condições básicas, prevenir a autooxidação ou a oxidação gerada por radicais livres, quando presentes em baixa concentração relativa ao substrato a ser oxidado e o radical formado após a ligação deve ser mais estável.

Os compostos fenólicos exibem grande quantidade de propriedades fisiológicas (como antialérgica, antiarteriogênica, antiinflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotetiva e vasodilatadora), mas o principal efeito dos compostos fenólicos tem sido atribuído à sua ação antioxidante em alimentos (BALASUNDRAM *et al.*, 2006).

Segundo Kim (2003), os compostos fenólicos, presentes nas frutas e hortaliças, são um dos principais responsáveis pela atividade antioxidante destas. Seu conteúdo final pode estar influenciado por fatores como: a maturação, a espécie, práticas de cultivo, origem geográfica, estágio de crescimento, condições de colheita e processo de armazenamento.

A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos está diretamente ligada à sua estrutura química, a qual pode estabilizar radicais livres. Esses participam de processos degenerativos celulares que provocam a aterosclerose, câncer e outras doenças (MAMEDE; PASTORE, 2004).

Há evidências de que os fenólicos encontrados em uvas e vinhos tintos podem inibir a oxidação *in vitro* da lipoproteína humana de baixa-densidade (LDL)

(FRANKEL; WATERHOUSE; TEISSEDE, 1995), assim como é possível seu uso na redução de risco de aterosclerose (KOVAC; PEKIC, 1991).

2.3.1.1 Antocianinas

A maioria dos compostos, que variam do vermelho ao azul, que ocorrem em flores, frutos, e outras partes das plantas pertencem ao maior grupo de pigmentos naturais, um tipo de flavonóide, denominados de antocianinas (MEYER, 1982). Também atuam como filtro das radiações ultravioletas nas folhas. Em certas espécies de plantas estão associadas com a resistência aos patógenos e atuam melhorando e regulando a fotossíntese (MAZZA; MINIATI, 1993).

O termo antocianina, derivado do grego, significa flor azul. Embora o termo tenha sido dado primeiramente por Marquart em 1935 para designar os pigmentos azuis em flores, desde então o termo antocianinas também é responsável pela pigmentação vermelha, púrpura, violeta da maioria das espécies do reino vegetal, com exceção notável dos tomates e das beterrabas que devem sua coloração aos pigmentos licopeno e betalaina, respectivamente (JACKMAN *et al.*, 1987).

Os flavonóis são importantes por atuarem na copigmentação das antocianinas através de mecanismo de complexação intermolecular, tornando mais estável a molécula antociânica. Dentre os compostos que exibem esta ação, os flavonóis são os mais eficazes (MALIEN-AUBERT *et al.*, 2001).

Antocianidinas livres são raramente encontradas em plantas, ocorrendo comumente glicosiladas com açúcares que estabilizam a molécula (FRANCIS, 2000). São compostos solúveis em água e altamente instáveis em temperaturas elevadas (SHAHIDI; NACZK, 1995).

De acordo com KONG *et al.* (2003), existem aproximadamente 400 antocianinas diferentes. Para Jackman e Smith (1996), as antocianinas encontram-se distribuídas em numerosas famílias de plantas:

- Vitaceae (uva),
- Rosaceae (cereja, ameixa, framboesa, morango, amora, maçã, pêssego, etc.),
- Solanaceae (tamarindo, batata),
- Saxifragaceae (groselha preta e vermelha),

- Ericaceae (mirtilo, oxicoco),
- Cruciferae (repolho roxo, rabanete),
- Leguminoseae (vagem) e
- Gramineae (sementes de cereais).

Segundo Bobbio e Bobbio (2001), apesar de largamente disseminadas na natureza são poucas as fontes comercialmente utilizáveis de antocianinas. Podemos citar entre essas fontes o resíduo da fabricação do vinho e do suco de uva, que produz o pigmento usado em alimentos com o nome de enocianina.

As antocianinas também apresentam propriedades farmacológicas, sendo utilizadas para fins terapêuticos. Já foram comprovados cientificamente seus efeitos anticarcinogênico (HAGIWARA *et al.*, 2001, KAMEI *et al.*, 1998), antioxidante (WANG *et al.*, 2000; YODIM; MARTIN; JOSEPH, 2000), e antiviral (KAPADIA *et al.*, 1997).

Os principais fatores que influenciam a estabilidade das antocianinas são a estrutura química, o pH, a temperatura, a luz, a presença de oxigênio, a degradação enzimática e as interações entre os componentes dos alimentos, tais como ácido ascórbico, íons metálicos, açúcares e copigmentos (FRANCIS, 1989).

O pH exerce profunda influência na cor das antocianinas, assim como na sua estabilidade. As antocianinas são mais estáveis em soluções ácidas do que em neutras e alcalinas. No entanto são rapidamente destruídas pelo aquecimento durante o processamento e estocagem de alimentos. Muitos estudos demonstraram relação logarítmica entre a destruição das antocianinas e o aumento aritmético da temperatura. Processos utilizando baixo tempo em alta temperatura têm sido recomendados para melhor retenção dos pigmentos. No caso de sucos de frutas vermelhas, perdas de antocianinas mostraram-se insignificantes para tratamentos térmicos com duração inferior a 12 minutos a 100°C (MARKAKIS, 1982).

Em 1975, Palamidis e Markakis observaram que a presença de luz acelerou a destruição das antocianinas em bebidas carbonatadas, coloridas com antocianinas extraídas da polpa da uva. O tempo de meia-vida das antocianinas a 20°C no escuro foi de 416 dias, diminuindo para 197 dias quando as bebidas foram expostas à luz ambiente nas mesmas condições de temperatura.

Tressler e Pederson descobriram em 1936 o efeito do oxigênio na degradação das antocianinas. Eles observaram que a mudança da cor roxa para

marrom em sucos de uva engarrafados podia ser prevenida simplesmente enchendo-se completamente as garrafas, ou seja, eliminando o oxigênio do seu interior. As antocianinas também podem ser degradadas por enzimas endógenas presentes nos tecidos das plantas, tais como glicosidases, polifenol oxidases e peroxidases (FRANCIS, 1989).

2.4 EXTRAÇÃO

Existem diversos métodos para a extração dos compostos antioxidantes em vegetais, conhecidos também como substâncias bioativas. Dentre esses, podem ser citados os tradicionais métodos de extração utilizando solventes orgânicos (como água, etanol, éter e metanol) e a extração supercrítica que mediante mudanças na pressão e na temperatura transforma o dióxido de carbono (CO₂) em fluido supercrítico para a extração (LEAL *et al.*, 2003; REHMAN; HABIB; SHAH, 2004).

Segundo Shaidi e Naczk (1995), sob o ponto de vista químico não há como selecionar a metodologia mais eficiente para a extração dos compostos antioxidantes pois podem sofrer a influência de diversos fatores, podendo citar a natureza do vegetal, o solvente empregado na extração, o tamanho das partículas, o tempo e a temperatura de extração.

A natureza química desses compostos nos alimentos varia do simples ao altamente polarizado, há grande variedade de compostos bioativos nos vegetais (como os ácidos fenólicos, antocianinas e taninos) e diferentes quantidades presentes, além da possibilidade de interação dos compostos antioxidantes com carboidratos, proteínas e outros componentes dos alimentos. Alguns desses complexos, assim como alguns fenólicos com alto peso molecular, são altamente insolúveis em água. Entretanto, os extratos sempre contêm mistura de substâncias fenólicas de diferentes classes que são solubilizadas no solvente do sistema escolhido. Estágios adicionais podem ser necessários para purificar o isolado e remover substâncias fenólicas e não-fenólicas indesejáveis (SHAIIDI; NACZK, 1995).

O tempo também influencia na extração de compostos fenólicos. Em 2005 Lapornik, Prosek e Wondra realizaram um estudo com resíduos de frutas vermelhas, onde os extratos foram preparados com etanol, metanol e água e tempos de extração de 1, 12 e 24 horas. Comparando-se os resultados, o conteúdo de polifenóis diminuiu no extrato aquoso com maior tempo de extração, enquanto nos

extratos metanólicos e etanólicos houve acréscimo no conteúdo de fenóis com o aumento do tempo.

A temperatura é outro fator que durante a extração pode afetar os compostos bioativos de diferentes maneiras. O conteúdo total de fenólicos diminui com o aumento da temperatura (CONDE *et al.*, 1998), assim como o conteúdo de proantocianidina nas mesmas condições (CADAHÍA, *et al.*, 1998). Já para Kim *et al.* (2006), que estudaram efeito do aquecimento e das condições físicas de sementes de uva na atividade antioxidante dos extratos, afirmaram que o aquecimento das sementes de uva favoreceu a liberação de compostos fenólicos o que aumentou a quantidade de compostos ativos em seus extratos.

2.5 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

Segundo Salunkhe, Chavan e Kadam (1989), os métodos Folin-Denis e Folin-Ciocalteu são exemplos de métodos utilizados para a determinação de fenólicos totais.

O ensaio de Folin-Ciocalteu (1927) tem sido utilizado para mensurar os fenólicos totais em produtos naturais, mas o seu mecanismo básico é uma reação de oxi-redução. Embora não deva caracterizar a atividade antioxidante, este método é um dos melhores para estimar a atividade antioxidante de amostras de alimentos (ROGINSK; LISSI, 2005).

Existe uma controvérsia sobre o que tem sido detectado no método de Folin-Ciocalteu, se somente fenóis ou fenóis de agentes redutores adicionados de quelatos de metal. O método de Folin-Ciocalteu é simples e pode ser útil na caracterização e padronização de amostras naturais. O método sofre a interferência de várias substâncias, particularmente açúcares, aminas aromáticas, enxofre, ácidos orgânicos, ácido ascórbico e redutores, e a eliminação dos interferentes deve ser feita (RIBEIRO, 2007).

2.6 DETERMINAÇÃO DAS ANTOCIANINAS TOTAIS

Os pigmentos antociânicos são importantes para a qualidade dos alimentos por causa de sua contribuição para a cor e aparência. Há um crescente aumento do interesse na quantidade de antocianinas nos alimentos e plantas devido ao seu

provável benefício à saúde. A quantidade de antocianinas também pode ser mais um critério na aquisição, no controle de qualidade e especificações de sucos de frutas, plantas e corantes naturais (LEE; DURST; WROLSTAD, 2005).

Segundo Malacrida e Motta (2006) existem vários métodos para quantificar antocianinas em alimentos. Todos esses métodos necessitam extração prévia das antocianinas dos alimentos a serem analisados.

As antocianinas, em pH baixo, encontram-se predominantemente na forma de cátion flavílio, o qual apresenta coloração vermelha em solução aquosa. Em pH alto, esse cátion é convertido em outras espécies incolores (REVILLA; RYAN; MARTIN-ORTEGA, 1998).

Em vegetais e frutas frescas existem poucos compostos que podem absorver energia na região de absorção máxima das antocianinas (465 a 550 nm). Desta forma, a quantificação de antocianinas é realizada por métodos espectrofotométricos baseados em medições simples de absorbância em comprimentos de onda adequados (WROLSTAD, 1976; JACKMAN; SMITH, 1996).

O método de diferença de pH está sendo muito usado em análises de alimentos, para avaliar a qualidade tanto em alimentos in natura quanto processados. O método pode ser usado para a determinação da quantidade total de antocianinas monoméricas, baseado na mudança estrutural das antocianinas pela absorbância em pH 1,0 e 4,5. O método pode ser utilizado em pesquisas e no controle de qualidade, para determinar a quantidade de antocianinas em frutas, vinhos, corantes naturais, e outras bebidas (LEE; DURST; WROLSTAD, 2005).

2.7 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A determinação da capacidade antioxidante de uma amostra pode depender da tecnologia e do radical livre gerador ou oxidante utilizado nesta medida. Além disso, a comparação de diferentes métodos analíticos constitui um fator chave para ajudar os pesquisadores a escolherem um método e entender os resultados obtidos através do mesmo (CAO; PRIOR, 1998).

Um fator que promove distintos desafios aos ensaios de determinação da capacidade antioxidante é que dentro de sistemas biológicos existem pelo menos quatro fontes gerais de antioxidantes: (1) enzimas, como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase; (2) moléculas grandes (albumina, ceruloplasmina,

ferritina e outras proteínas); (3) moléculas pequenas (ácido ascórbico, glutatona, ácido úrico, tocoferol, carotenóides e polifenóis); e (4) alguns hormônios (estrogênio, angiotensina, melatonina, etc). Por outro lado existem múltiplos radicais livres e fontes oxidantes, e ambos, oxidantes e antioxidantes têm diferentes características químicas e físicas. Individualmente os antioxidantes, em alguns casos, podem agir através de múltiplos mecanismos em um sistema único, ou através de diferentes mecanismos únicos dependendo do sistema de reação. Além disso, os antioxidantes podem responder de diferentes maneiras frente a diferentes radicais ou fontes oxidantes (PRIOR *et al.*, 2005).

Vários são os métodos para testar a atividade antioxidante, podendo ser usados para compostos isolados e extratos. Estes métodos podem ser testados *in vitro* e *in vivo*. Não existe um método satisfatório que consiga avaliar a atividade antioxidante total de uma amostra, pois existem vários mecanismos antioxidantes que podem ocorrer (OU *et al.*, 2002), sendo seqüestro de radicais, habilidade redutora, complexação de íons metálicos e outros. Também há uma dificuldade de comparar estes métodos, devido à complexidade e princípios diferentes das reações. Alguns métodos antioxidantes produzem resultados diferentes ou mesmo contraditórios, tornando-se algumas vezes impossível qualquer comparação entre eles (ALONSO *et al.*, 2002).

Awika *et al* (2003), observaram alta correlação entre o método ABTS, DPPH e ORAC na análise de sorgo e seus produtos. Kuskoski *et al* (2005), encontraram correlação entre a determinação de fenólicos totais e a atividade antioxidante para os métodos DPPH e ABTS com polpas de frutas. As conclusões foram semelhantes para esses dois métodos, apesar de apresentarem diferenças metodológicas.

2.7.1 DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Em 1922, Goldschmidt e Renn descobriram um radical livre estável de cor violeta, que agora é usado como reagente colorimétrico para processos oxi-redução (IONITA, 2005). O DPPH pode ser mantido indefinidamente com pouca decomposição porque ele não reage com o oxigênio. O método provou ser bastante útil em série de investigações, tais como a determinação das propriedades antioxidantes de amins, fenóis ou compostos naturais (vitaminas, extratos vegetais, medicamentos) e para inibir reações hemolíticas. DPPH tem a cor violeta intensa

como KMnO_4 e quando reduzido a seu homólogo 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH-H) se torna amarelo-alaranjado (IONITA, 2005).

O método DPPH baseia-se na redução dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH $^{\bullet}$) através da doação de um átomo de hidrogênio pelo polifenol à molécula do radical (ARUOMA *et al.*, 1997). Para essa análise utiliza-se uma solução alcoólica de DPPH, que absorve no comprimento de onda próximo de 517nm, e à medida que seu elétron deixa de ser desemparelhado, a absorção decresce e ocorre a mudança de coloração frente às moléculas antioxidantes testadas (DI MAMBRO; MARQUELE; FONSECA, 2005).

As vantagens do método DPPH são:

- avaliar uma grande quantidade de amostras em um período curto de tempo e rapidamente;
- um método sensível que detecta pequenas concentrações do ativo testado;
- permite avaliar antioxidantes lipofílicos, já que o solvente do processo é metanol ou etanol (DI MAMBRO; MARQUELE; FONSECA, 2005).

Esse método apresenta em contrapartida, o pH do meio reacional, que é em torno de 5,5, é diferente do pH fisiológico, o que se constitui numa desvantagem pela dificuldade de transferir os resultados para as condições *in vivo* (DI MAMBRO; MARQUELE; FONSECA, 2005).

2.7.2 ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

A capacidade sequestrante de radicais ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) de extratos de plantas medicinais, extratos antociânicos de frutas, vinhos e extratos de gramíneas foram avaliadas respectivamente por Pietta, Simonetti e Mauri (1998), Espín *et al.* (2000), Landrault *et al.* (2001) e Pukalskas *et al.* (2002). Este método é baseado na formação do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ pelo radical ferrilmioglobina gerado pela reação entre a metamioglobina e H_2O_2 na presença de peroxidase. Outros agentes oxidantes podem ser utilizados. Há, portanto, a formação de um radical cromóforo ($\text{ABTS}^{\bullet+}$), onde a atividade antioxidante é avaliada pela supressão da cor do radical quando substâncias antioxidantes são adicionadas no meio.

O princípio do método consiste em monitorar o decaimento do radical produzido pela oxidação do ABTS, causado pela adição de uma amostra contendo fenólicos. O ABTS absorve na faixa de 600 – 750 nm e pode ser facilmente determinado por espectrofotometria. Na ausência de fenólicos, o ABTS é estável, mas reage energeticamente com um doador de H, como os fenólicos, sendo então convertido em uma forma incolor de ABTS. Os autores determinaram que a quantidade de ABTS consumida está relacionada à reação com os fenólicos presentes na amostra, a qual é expressa como relativos ao trolox. Este valor foi designado TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), sigla em inglês para capacidade antioxidante equivalente ao trolox (RIBEIRO, 2007).

O método ABTS possui muitas vantagens em sua utilização como um ensaio operacionalmente simples, muito usado em pesquisas de laboratório para estudar a capacidade antioxidante de muitos compostos e amostras de alimentos (CAO; PRIOR, 1998; GIL, 2000; PROTEGGENTE *et al.*, 2002; PELLEGRINI *et al.*, 2003). Pode ser usado para soluções com diferentes valores de pH, bem como para o estudo da influência do pH nos mecanismos antioxidantes. É solúvel em solventes aquosos e orgânicos e não é afetado por força iônica, assim pode ser usado para determinar a capacidade antioxidante de extratos e fluidos corpóreos, hidrofílicos e lipofílicos (AWIKA *et al.*, 2003).

Diversos métodos são estudados para que se possa determinar a atividade antioxidante dos alimentos e que consigam detectar uma maior quantidade desses compostos. Os antioxidantes são conhecidos por combater os radicais livres que estão associados a muitas doenças, sendo a uva um dos alimentos que trazem muitos benefícios a saúde devido à presença de diversos compostos antioxidantes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS

3.1.1 Uvas

As uvas da cv. Isabel foram obtidas do Ceasa de Curitiba no mês de março de 2007 e foram utilizadas para elaboração dos extratos, do suco e da geléia.

3.1.2 Sucos comerciais

Foram adquiridos três sucos comerciais diferentes nos supermercados de Curitiba. Desses sucos dois eram prontos para beber e um, tanto poderia ser consumido diretamente, como poderia ser diluído antes do consumo. Foram nomeados sucos “A”, “C” e “D”.

3.2 PADRÕES

3.2.1 Fenólicos totais

Como padrão da análise dos fenólicos totais utilizou-se a catequina da empresa Sigma Aldrich.

3.2.2 Análise da capacidade antioxidante

Utilizou-se o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico 97%, Sigma-Aldrich) e o ácido ascórbico (Sigma-Aldrich); como antioxidante de referência. Foram utilizados também outros padrões para análise da cinética, como α -tocoferol, butil-hidroxi-anisol, ácido gálico e quercitina, todos padrões da empresa Sigma Aldrich. Esses padrões foram diluídos em etanol 80%.

3.3 EQUIPAMENTOS

Para homogeneização foi utilizado um homogeneizador Marconi MA-102. As leituras das análises foram realizadas no espectrofotômetro UV/visível (UV-1650 PC, da Shimadzu).

3.4 PREPARO DAS AMOSTRAS

As uvas obtidas foram imediatamente higienizadas, os grãos foram separados dos cachos, pesados e homogeneizados. Parte dos grãos foi reservada para o preparo do suco e outra parte para o preparo dos extratos. A geléia foi feita a partir do resíduo da extração do suco.

3.4.1 Preparo do suco em laboratório

O suco foi elaborado em um extrator conforme figura 1 por arraste de vapor. Após a extração, o suco foi transferido a garrafas esterilizadas e armazenado a 4°C até o momento da análise.



FIGURA 1: EXTRATOR UTILIZADO NA ELABORAÇÃO DO SUCO DE UVA.

3.4.2 Preparo da geléia em laboratório

Após o preparo do suco, utilizou-se o resíduo para o preparo da geléia. O resíduo foi peneirado para retirada das sementes, a massa obtida foi misturada com o açúcar e levada ao fogo médio-baixo, por uma hora, até obtenção de consistência de geléia. O produto foi mantido em vidros esterilizados sob refrigeração (4°C) até o momento da análise.

3.4.3 Preparo dos extratos

Foram elaborados três tipos de extrato, um aquoso, um hidroalcoólico a frio e um hidroalcoólico a quente.

Extrato aquoso: quantidades iguais de água e uva foram homogeneizadas em homogeneizador Marconi MA-102 em velocidade quatro por dez minutos. Após esse período a amostra foi centrifugada a 18000g. O precipitado foi novamente adicionado de água para mais uma extração de dez minutos e posteriormente centrifugado. O processo se repetiu com o precipitado por mais uma vez. Todos os sobrenadantes foram reunidos e liofilizados constituindo o extrato aquoso. Até o momento da análise o extrato foi mantido a -18°C.

Extrato hidroalcoólico a frio: obtido da mesma forma que o anterior, mas a extração foi efetuada com etanol 80%. O extrato foi mantido a -18°C até o momento das análises.

Extrato hidroalcoólico a quente: as uvas foram submetidas à secagem em estufa a vácuo, a 45°C para eliminação do excesso de água. Posteriormente foram homogeneizadas em homogeneizador Marconi MA-102 em velocidade quatro por dez minutos, empregando-se etanol 80% como solvente. Após centrifugação o sobrenadante foi reservado e o precipitado foi adicionado novamente de etanol 80% e levado ao extrator de Soxhlet, onde ficou em extração por oito horas. O resíduo do Soxhlet foi levado ao homogeneizador com etanol a 80%, proporção 1:2. Todos os sobrenadantes foram misturados e levados ao evaporador rotatório sob pressão reduzida para eliminação do etanol a 40°C. O extrato foi mantido a -18°C até o momento das análises.

3.5 MÉTODOS

3.5.1 Determinação de fenólicos totais

A quantificação dos fenólicos totais dos extratos e produtos foi realizada de acordo com a metodologia de Horwitz (1980). A leitura espectrofotométrica foi feita a 720nm após a redução do reagente pelos compostos fenólicos. Os resultados foram expressos em mg de catequina por 100g de uva.

3.5.2 Determinação de antocianinas totais

A metodologia utilizada na determinação de antocianinas totais dos extratos foi de diferença de pH, de acordo com Lee *et al.*, 2005. Foram elaboradas duas soluções tampão, uma de cloreto de potássio/ácido clorídrico de pH 1,0 (0,025M), outra de acetato de sódio/ácido clorídrico de pH 4,5 (0,4M). As amostras foram diluídas nessas soluções tampão, a concentração da amostra em pH 1,0 deve apresentar leitura entre 0,2 e 1,4AU, pois é o intervalo de linearidade do espectrofotômetro. Foram feitas leituras a 520nm e 700nm, tanto no tampão de pH 1,0 quanto de pH 4,5. A leitura a 700nm é realizada para descontar a turbidez da amostra. O cálculo da absorbância final foi feito a partir da fórmula abaixo:

$$A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH1,0} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH4,5}$$

A concentração total das antocianinas monoméricas foi expressa em cianidina-3-glicosídeo.

$$\text{Antocianinas monoméricas (mg/100g)} = A \times PM \times FD \times 100 / (\epsilon \times 1)$$

Onde:

A = Absorbância;

PM = Peso molecular;

FD = Fator de diluição e

ϵ = Absortividade molar

A concentração final de antocianinas (mg/100g) foi calculada com base no volume de extrato e peso da amostra (PM: 449,2 e ϵ : 26900).

3.5.3 Determinação da capacidade antioxidante

3.5.3.1 Método DPPH

A medida da atividade seqüestrante do radical DPPH[•] foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), em triplicata. Para avaliação da atividade antioxidante os extratos e produtos elaborados reagiram com o radical estável DPPH, padrão Sigma-Aldrich, em uma solução de etanol.

A redução do radical DPPH foi medida através de um monitoramento contínuo do declínio da absorbância a 515nm por um período de duas horas até valores estáveis de absorção. Após sucessivos testes, com padrões antioxidantes de comportamentos cinéticos diferentes como α -tocoferol, BHA, ácido gálico e quercitina e vitamina C, foi adotado um tempo padrão de leitura de uma hora (tempo necessário para que as substâncias em teste fossem oxidadas, alcançando um platô não alterado após esse período).

Para expressar a atividade antioxidante utiliza-se o EC₅₀, ou seja, a concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% o DPPH inicial da reação (ARBOS, 2004). Como padrões desse ensaio foram utilizados como antioxidantes de referência, trolox e ácido ascórbico. Os extratos, o suco e a geléia foram diluídos em etanol 80% até que fosse obtida uma inibição de 20 a 80% em comparação com a absorbância do branco. Os resultados são expressos em TEAC (atividade antioxidante equivalente ao trolox) e VCEAC (atividade antioxidante equivalente a vitamina C).

3.5.3.2 Método ABTS

O teste foi realizado conforme descrito por Kuskoski *et al.* (2005), baseado nos autores Re *et al.* (1999) e Rice-Evans, Miller e Paganga (1996), com modificações. Preparou-se uma solução catiônica de ABTS, Sigma – Aldrich, misturando em partes iguais (v:v) de solução ABTS 7,0mM e de solução de persulfato de potássio 2,45mM. Esta reagiu por 12 horas, em temperatura ambiente e ausência de luz. Após formado o radical ABTS^{•+}, adicionou-se etanol à solução até

obter um valor de absorvância de 0,700 ($\pm 0,05$) a 754nm. A determinação da absorvância das amostras foi realizada em temperatura ambiente, 23°C (± 1), após sete minutos de reação. Os extratos, o suco e a geléia foram diluídos em etanol 80% até que fosse obtida uma inibição de 20 a 80% em comparação com a absorvância do branco. Como padrões desse ensaio foram utilizados como antioxidantes de referência o trolox e o ácido ascórbico. Os resultados foram expressos em TEAC e VCEAC.

3.5.4 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada para verificar qual era o composto presente em maior quantidade na uva. A análise foi realizada com o extrato hidroalcoólico a frio.

As análises foram realizadas por CLAE em aparelho Merck-Hitashi, composto de bomba L7100, degaseificador de solventes L7812, válvula de injeção Rheodyne. 7725i com loop de 2ul, forno L-7300, detector DAD dos dados pela ChemiStation Lachrom®. Utilizou-se a coluna XTerra®RP₁₈, com partículas de 5µm. A descrição do gradiente de fase móvel está na tabela 2.

TABELA 2 – CONCENTRAÇÕES DOS SOLVENTES EMPREGADOS DE ACORDO COM O TEMPO

<i>Tempo</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>Fluxo (ml/min)</i>
0	100	0	0	1,200
5	100	0	0	1,200
15	90	7	3	1,200
40	59	26	15	1,200
47	55	30	15	1,200
54	45	30	25	1,300
55	20	40	40	1,300
64	20	40	40	1,300
65	100	0	0	1,200
70	100	0	0	1,200

A) 0,01M ácido clorídrico + 0,2% ácido fosfórico + 1% fase diluente - FD (ácido sulfúrico 0,05M + 0,2% ácido fosfórico)

B) 95% metanol + 5% FD

C) 90% acetonitrila + 10% FD

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) utilizando o programa STATISTICA, versão 6.0 (2001) (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). O Teste Tukey (HSD) foi aplicado quando detectada diferença entre os fatores ao nível 5% de significância ($p < 0,05$). As determinações foram realizadas em triplicata. O teste da normalidade dos dados foi obtido por Shapiro-Wilk. Para cálculo da estatística (W) de Shapiro-Wilk e da sua probabilidade (p-valor), o Assistat, VERSÃO 7.5 BETA (2008) utiliza o Algorithm AS R94, Applied Statistics (1995). As tabelas com o cálculo dos quadrados médios de todas as análises estatísticas encontram-se no apêndice.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 FENÓLICOS TOTAIS E ANTOCIANINAS TOTAIS

Os compostos fenólicos são responsáveis pela cor, adstringência e estrutura, sendo as antocianinas, os taninos e os ácidos fenólicos, os mais importantes (MIELLE *et al.*, 1990). Goldy, Ballinger e Maness, (1986) verificaram a presença de 31 antocianinas diferentes em uvas da espécie *Vitis labrusca* (variedade Concord).

A catequina, a epigallocatequina, as procianidinas e os polímeros de taninos, são encontrados em maior quantidade nas sementes e no engaço da uva (MAMEDE; PASTORE, 2004).

De acordo com Falcão *et al.* (2007) o conteúdo de compostos fenólicos que prevalece nos produtos elaborados com uva pode ser dependente de vários fatores, como a variedade da uva, o método aplicado na extração destes compostos e as condições de armazenamento. Os fenóis em geral são altamente sensíveis à oxidação enzimática e não-enzimática (HRAZDINA; BORZEL; ROBINSON, 1970).

Na figura 2 é possível visualizar os tubos contendo concentrações crescentes de catequina.



FIGURA 2 – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DOSAGEM DE FENÓLICOS TOTAIS

A curva de calibração para determinação dos fenólicos totais, usando catequina como padrão, foi definida pela equação $y = 3,6347x + 0,0376$ ($R^2 = 0,9989$). As curvas de cada extrato de uva elaborado, para a geléia e para o suco de uva poderão ser observadas nos gráficos 1, 2, 3, 4 e 5. A tabela 3 resume os resultados.

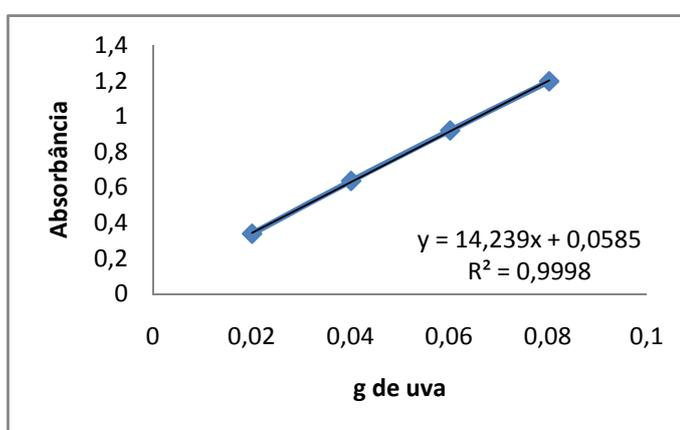


GRAFICO 1 – DETERMINAÇÃO DOS FENÓLICOS TOTAIS NO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A FRIO

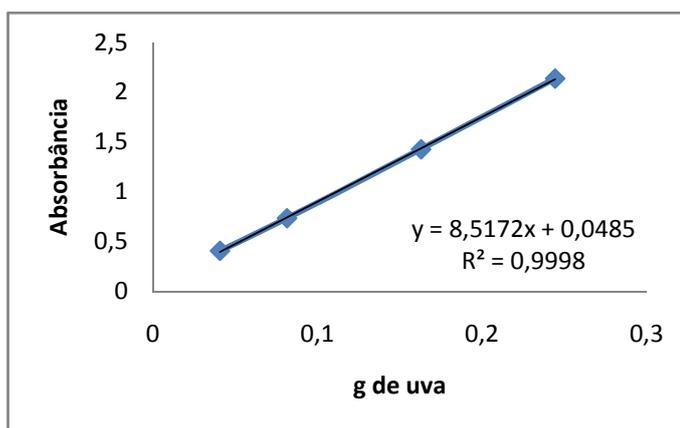


GRAFICO 2 – DETERMINAÇÃO DOS FENÓLICOS TOTAIS NO EXTRATO AQUOSO

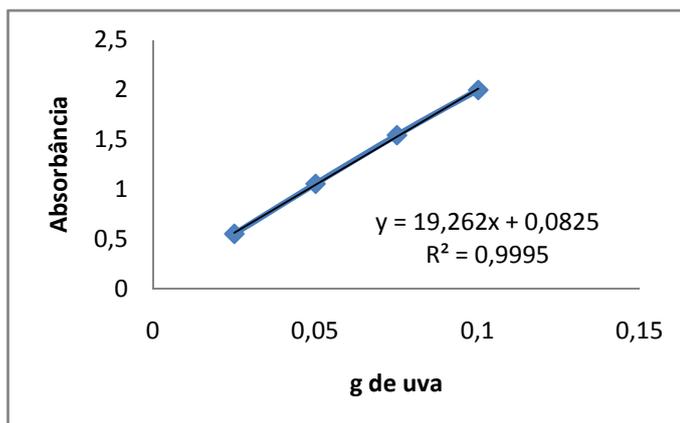


GRAFICO 3 – DETERMINAÇÃO DOS FENÓLICOS TOTAIS NO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A QUENTE

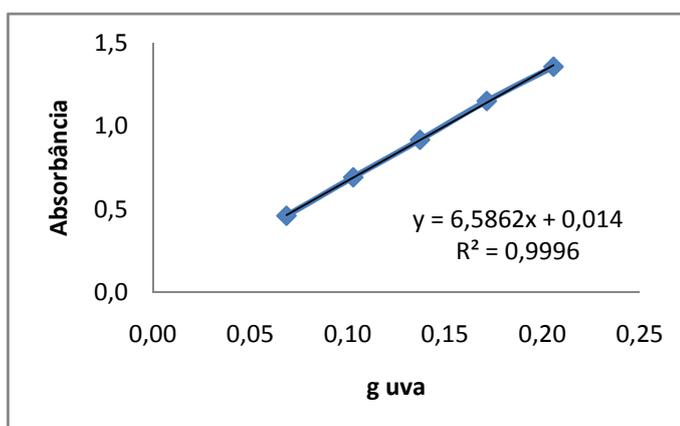


GRAFICO 4 – DETERMINAÇÃO DOS FENÓLICOS TOTAIS NA GELÉIA

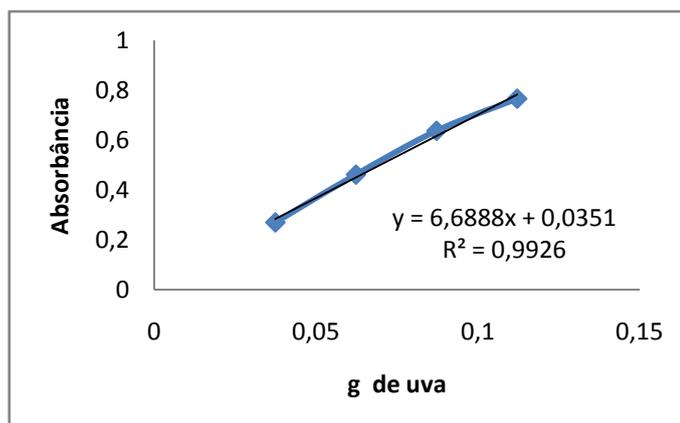


GRAFICO 5 – DETERMINAÇÃO DOS FENÓLICOS TOTAIS NO SUCO DE UVA

Além dos resultados de fenólicos totais a tabela 3 resume os resultados da determinação de antocianinas totais.

TABELA 3 – DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS E ANTOCIANINAS TOTAIS DOS EXTRATOS E PRODUTOS ELABORADOS (média \pm desvio padrão)

	Fenólicos totais (mg catequina/100g uva)	Antocianinas totais (mg/100g de uva)
Aquoso	235,16 \pm 22,62 ^c	12,98 \pm 0,07 ^b
Hidroalcoólico a frio	403,17 \pm 4,36 ^b	34,82 \pm 0,79 ^a
Hidroalcoólico a quente	559,77 \pm 4,12 ^a	4,90 \pm 0,10 ^d
Geléia	176,76 \pm 2,56 ^e	2,84 \pm 0,08 ^e
Suco	188,01 \pm 5,32 ^d	10,05 \pm 0,18 ^c

As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O extrato hidroalcoólico a quente foi o que apresentou a concentração mais elevada de fenólicos totais (559,77mg/100g de uva) e a geléia de uva apresentou o teor mais baixo (176,76mg/100g de uva), sendo uma perda de 68% na produção da geléia. Abe *et al.* (2007), analisaram a quantidade de fenólicos totais de diversas variedades de uva e seus resultados ficaram compreendidos entre 65 e 391mg/100g equivalente de ácido gálico.

Dávalos, Bartolomé e Gómez-Cordovés (2005) obtiveram como resultados de fenólicos totais em sucos de uvas comercializados na Espanha, valores entre 70,5 \pm 1,0 e 117,7 \pm 2,0mg de ácido gálico/100 mL transformando os valores encontrados do suco de uva elaborado em laboratório para mg de catequina para 100ml de suco, corresponde a 234,26 \pm 6,63, mas não é possível fazer comparação pois segundo Rice-Evans *et al.* (1995) o ácido gálico apresenta atividade antioxidante maior do que a catequina, que conta com cinco grupos hidroxilas em sua estrutura.

Plessi, Bertelli e Albasini (2007) avaliaram o conteúdo de polifenóis totais em geléias elaboradas com diferentes variedades de frutos em baga (amora preta, framboesa, groselha vermelha e groselha negra) e verificaram resultados de fenólicos totais em média de 402, 286, 333 e 737mg.100g⁻¹ para as geléias de amora preta, framboesa, groselha vermelha e groselha negra, respectivamente.

Em avaliação feita por Soares *et al.* (2008) o conteúdo de fenólicos totais encontrados para a casca da uva Isabel e Niágara foram de 196,83 e 183,04 mg de ácido gálico/100g casca respectivamente. A extração foi feita em solvente contendo 75% de acetona. Para Soares *et al.* (2008) o aumento dos fenólicos totais obtido em

relação à extração sem acetona foi de 7,78 vezes para a uva Isabel de 5,04 vezes para a variedade Refosco. Neste trabalho o aumento da extração de fenólicos totais do extrato hidroalcoólico a quente em relação ao extrato aquoso foi de 2,38 vezes.

Segundo Mamede e Pastore (2004) o período de maceração da uva para obtenção do mosto (suco da uva usado para fermentação) é determinante para a extração de compostos fenólicos.

O conteúdo de compostos fenólicos que prevalece nos produtos elaborados com uva pode ser dependente de vários fatores, entre eles, a variedade da uva, o método aplicado na extração destes compostos e as condições de armazenamento (FALCÃO *et al.* 2007).

Lee, Rennaker e Wrolstad (2008) observaram alta correlação ($R = 0,931$) entre a análise de antocianinas totais realizada com o método de pH diferencial, utilizado nesse trabalho, e a determinação pelo HPLC. Destacam também que o método do pH diferencial é simples, rápido e econômico para determinar a quantidade total de antocianinas, sendo uma boa alternativa para laboratórios que não possuem HPLC.

O extrato hidroalcoólico a frio foi o que apresentou a quantidade mais elevada de antocianinas totais em sua composição (34,82mg/100g de uva) e a geléia apresentou a quantidade mais baixa (2,84mg/100g de uva) dentre os extratos e produtos analisados. A perda de antocianinas mais expressiva aconteceu com a preparação da geléia sendo uma diminuição de 92% em relação a quantidade de antocianinas totais presentes na uva e 71% foi a perda de antocianinas no preparo do suco.

Conforme descrevem Malacrida e Mota (2006), as antocianinas são rapidamente destruídas pelo aquecimento durante o processamento e estocagem de alimentos. Nos processos em que houve a utilização de temperaturas elevadas por maior tempo as amostras apresentaram os menores valores de antocianinas totais 2,8; 4,9; e 10,05mg/100g de uva para a geléia, o extrato hidroalcoólico a quente e o suco, respectivamente. A quantidade de antocianinas do suco apresentou uma perda menos expressiva mesmo tendo no seu processo o aquecimento, devido à retirada do suco ter acontecido de forma contínua, ficando um menor tempo em contato com o calor.

Malacrida (2003) determinou a concentração de antocianinas em sucos de uva reconstituídos e não reconstituídos também chamados de simples, disponíveis

comercialmente. Os sucos de uva simples apresentaram concentrações médias de antocianinas (28,7mg/L) mais altas quando comparados aos sucos reconstituídos (17,3mg/L). Diferenças nos processamentos dos sucos podem ter contribuído para as distintas quantidades de antocianinas encontradas, uma vez que o suco reconstituído é elaborado a partir da diluição do suco concentrado de uva. O suco de uva elaborado em laboratório apresentou 125,2mg/L de suco, esse valor elevado em relação ao encontrado por Malacrida (2003) pode ser explicado pelo suco ser concentrado, como também pela diferença no processamento em relação aos comerciais.

O valor de antocianina total do extrato aquoso (34,82mg/100g de uva) foi próximo ao valor encontrado por Kuskoski *et al.* (2005) para a polpa de uva (30,9mg/100g). Já o conteúdo de antocianinas totais do extrato hidroalcoólico a frio (12,98mg/100g de uva) ficou muito próximo ao encontrado por Abe *et al.* (2007) para a uva Niágara rosada IAC 766, que obteve 12,8mg/100g de uva.

Em análise de antocianinas totais realizada por Falcão *et al.* (2007) com sistema modelo de geléia elaborada com uvas da variedade Isabel e Refosco, esta segunda apresentou a quantidade de antocianinas totais mais elevada em relação a Isabel sendo 2,4 vezes superior quando a extração era realizada com acetona 70%, e 2,6 vezes quando era realizada a extração com etanol 70%. Neste trabalho observou-se que a extração de antocianinas totais foi 7,1 vezes mais elevada quando o extrato foi elaborado com água em relação ao extrato hidroalcoólico a quente.

Para Abe *et al.* (2007) o conteúdo de antocianinas varia de acordo com a coloração da uva, pois as cultivares de uvas mais escuras apresentaram teores mais elevados de antocianinas, seguidas pelas uvas rosadas e sendo ausentes em uvas brancas.

Nas amostras testadas o extrato hidroalcoólico a frio apresentou porcentagem mais elevada de antocianinas totais (86% em relação à quantidade de fenólicos totais). O extrato hidroalcoólico a frio e a geléia foram os que apresentaram porcentagens menos expressivas de antocianina em relação à quantidade de fenólicos totais, sendo 0,9% para o extrato e 1,6% para a geléia. O extrato aquoso e o suco apresentaram 5,5% e 5,3% respectivamente. A baixa porcentagem de antocianinas na geléia e no extrato hidroalcoólico a quente pode ser explicada pela

utilização de altas temperaturas por tempo elevado, acarretando destruição das mesmas.

Observou-se uma perda da quantidade de compostos fenólicos totais, especialmente das antocianinas, com o processamento da uva.

4.2 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

4.2.1 Método DPPH

Segundo Blois (1958) e Arnao (2000), o radical livre DPPH é um cromóforo extremamente estável que apresenta um pico de absorção no comprimento de onda de 515 nm em meio etanólico e sua solução possui uma coloração violeta intensa.

A coloração da solução de DPPH em contato com as amostras em testes passa da coloração roxa intensa para amarela. A intensidade da cor varia de acordo com a concentração, conforme mostra figura 3.



FIGURA 3 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A FRIO AVALIDADO PELO MÉTODO DO DPPH

Podem ocorrer três tipos de comportamento cinético entre compostos com atividade antioxidante: substâncias que reagem rapidamente com o DPPH, chegando ao final da reação em menos de um minuto (cinética rápida); substâncias que finalizam a reação em até 30 minutos (cinética intermediária) e substâncias de cinética lenta que demoram mais de uma hora para completar a reação (cinética lenta) (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER, BERSET, 1995).

Devido a diferenças cinéticas existentes, avaliaram-se inicialmente diferentes concentrações de diferentes padrões para definir o tempo de reação com o radical

livre DPPH. Observou-se que alguns padrões tinham um caimento mais lento e outros, um caimento mais rápido. O comportamento cinético de diferentes padrões podem ser encontrados no gráfico 6.

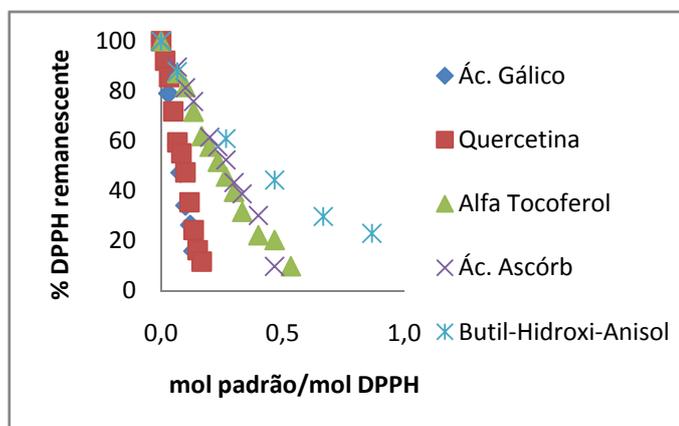


GRAFICO 6 – CURVA CINÉTICA DA REDUÇÃO DO DPPH DE DIFERENTES SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O ácido gálico e a quercetina apresentaram atividade antioxidante superior em relação aos outros padrões. O BHA foi o composto que apresentou atividade antioxidante mais baixa entre os compostos analisados. O alfa tocoferol e o ácido ascórbico tiveram atividade antioxidante moderada, sendo entre os dois o ácido ascórbico o mais baixo.

A cinética do ácido gálico, alfa-tocoferol, ácido ascórbico e BHA estão de acordo com a cinética encontrada por Brand-Willians, Cuvelier e Berset (1995). A cinética da quercetina está de acordo com a encontrada por Peyrat-Maillard, Bonnely e Berset (2000).

Observou-se que o extrato hidroalcoólico a frio apresentou cinética lenta, por isso foi feita uma avaliação de tempo, com uma e com 24 horas. A comparação dos diferentes tempos do extrato hidroalcoólico a frio está expressa no gráfico 7.

A atividade antioxidante do extrato aquoso da uva na leitura após 24 horas foi 2,19 vezes superior à leitura com uma hora de reação. Na avaliação dos padrões que foram utilizados para determinação da atividade antioxidante, o trolox e o ácido ascórbico, nesses dois tempos de reação, uma e 24 horas, não foi observada alteração no comportamento cinético desses padrões, como mostram os gráficos 8 e 9. Essa diferença de comportamento ocorre pela variedade de compostos presentes na uva, sendo que alguns apresentam cinética lenta.

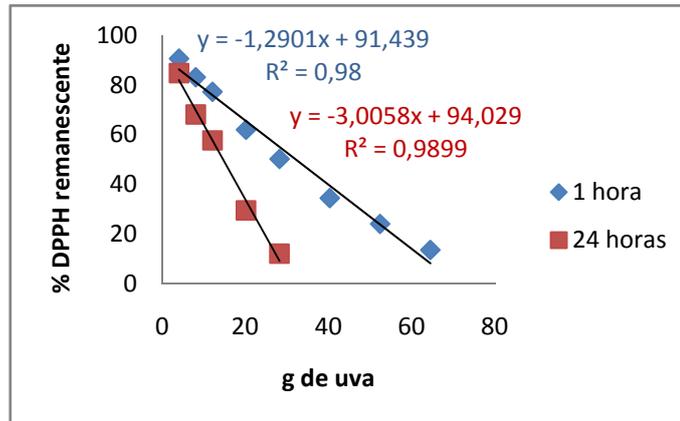


GRAFICO 7 – COMPORTAMENTO CINÉTICO DO EXTRATO AQUOSO COM TEMPO DE REAÇÃO DE UMA E 24 HORAS NA METODOLOGIA DO DPPH

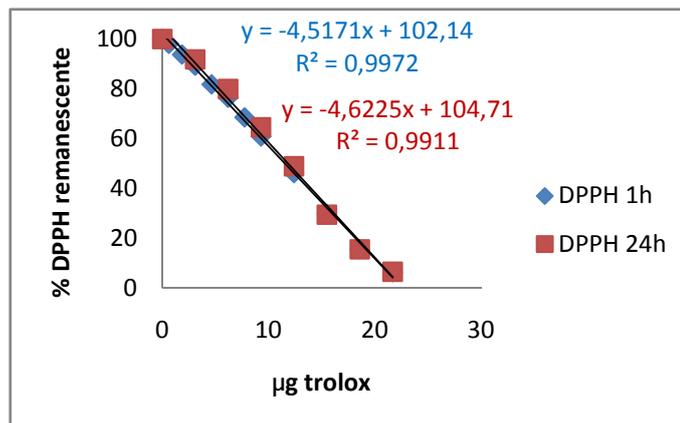


GRAFICO 8 – COMPORTAMENTO CINÉTICO DO TROLOX COM TEMPO DE REAÇÃO DE UMA E 24 HORAS NA METODOLOGIA DO DPPH

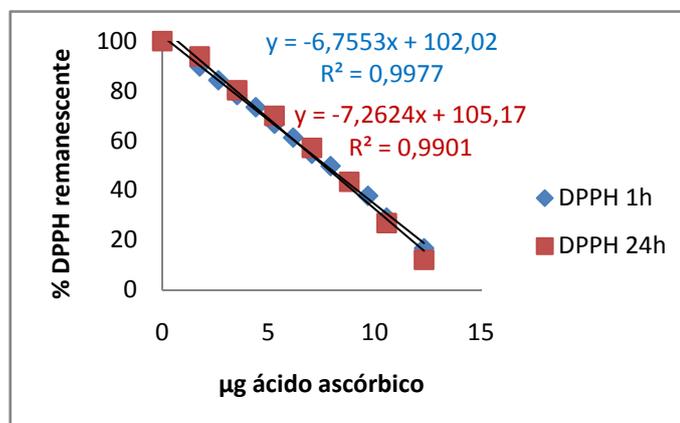


GRAFICO 9 – COMPORTAMENTO CINÉTICO DO ÁCIDO ASCÓRBICO COM TEMPO DE REAÇÃO DE UMA E 24 HORAS NA METODOLOGIA DO DPPH

O tempo escolhido para todas as análises foi de uma hora devido à variedade de compostos presentes nos extratos de uva, sendo alguns com cinética lenta, o que poderia, no tempo de 30 minutos, subestimar a capacidade antioxidante nas análises. O tempo de 24 horas foi descartado devido à quantidade reduzida de estudos encontrados adotarem esse o tempo em comparação a inúmeros outros estudos que utilizam uma hora de reação.

Kuskoski *et al.* (2005) fizeram uma comparação de tempo de leitura com 30 e 60 minutos na metodologia do DPPH para polpa de frutas. Foi observado na leitura em 60 minutos um aumento de até 50% na atividade antioxidante em algumas polpas de frutas. A polpa de uva teve um aumento de 21% em relação à primeira leitura feita em 30 minutos.

Para determinar o EC₅₀ dos padrões, foi feita uma curva para que fosse possível calcular o TEAC e o VCEAC. Essas curvas podem ser conferidas nos gráficos 12 e 13. O EC₅₀ é a concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% o DPPH inicial da reação e é calculado a partir da equação de reta obtida com cada extrato. Os valores de TEAC e VCEAC são calculados com os valores do EC₅₀ do trolox e ácido ascórbico, respectivamente, em relação ao EC₅₀ de cada extrato, isso corresponde a quanto de equivalentes do padrão há em determinada alíquota do extrato analisado.

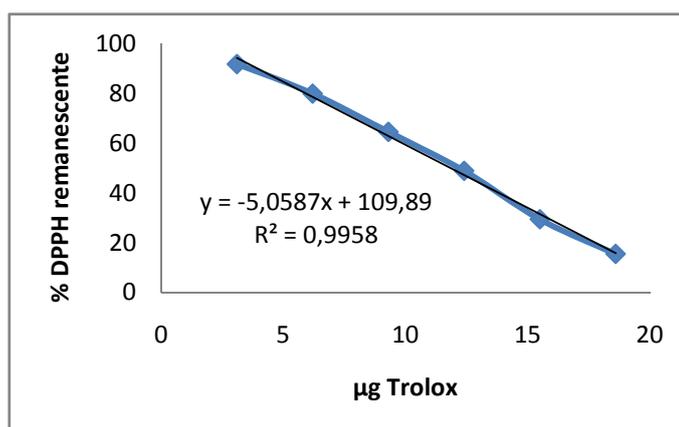


GRAFICO 10 – EQUAÇÃO DE RETA DO TROLOX EM REAÇÃO COM O DPPH

Para determinação do TEAC e VCEAC foi obtida uma equação de reta para cada extrato e produto, observando o comportamento em reação com o DPPH. As curvas para determinação da equação de reta podem ser observadas nos gráficos 12, 13, 14, 15 e 16. É possível observar que todas as curvas apresentaram um alto

coeficiente de correlação, embora não tenha sido possível avaliar o tipo de cinética para cada extrato e produto.

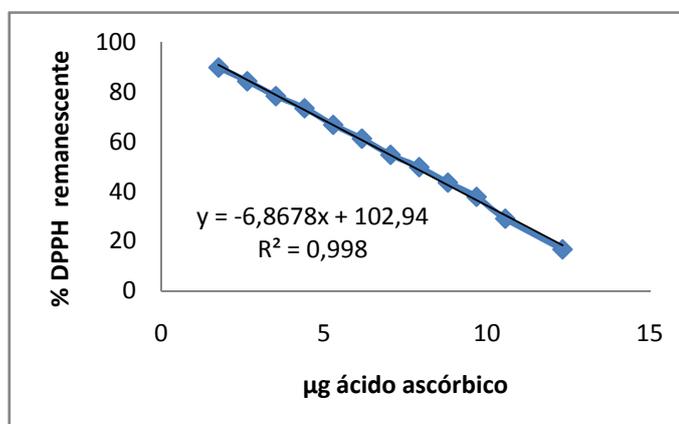


GRAFICO 11 – EQUAÇÃO DE RETA DO ÁCIDO ASCÓRBICO EM REAÇÃO COM O DPPH

As amostras do extrato aquoso quando misturadas com o etanol presente nas soluções de análise da atividade antioxidante deixavam a solução turva. Quanto maior a concentração do extrato mais turva se apresentava a solução quando misturada com o etanol. Dessa forma foi necessário fazer uma diluição prévia do extrato em etanol (1:2 ou 1:3) e posteriormente centrifugá-lo para que a reação e a leitura pudessem ocorrer. A centrifugação foi conduzida a 5300g por dez minutos para eliminar a turbidez. O mesmo foi realizado com as frações do extrato aquoso e com a geléia. Todos os extratos e a geléia foram diluídos em água deionizada para depois serem misturados ao etanol 80%, pois a diluição não era possível diretamente em etanol 80%.

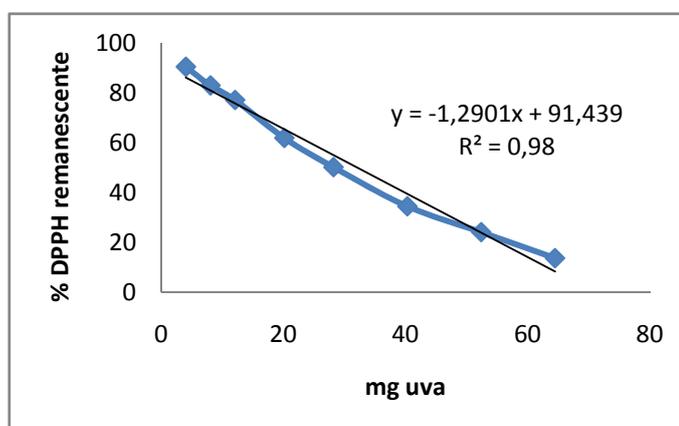


GRAFICO 12 – COMPORTAMENTO CINÉTICO DO EXTRATO AQUOSO UTILIZANDO A METODOLOGIA DO DPPH

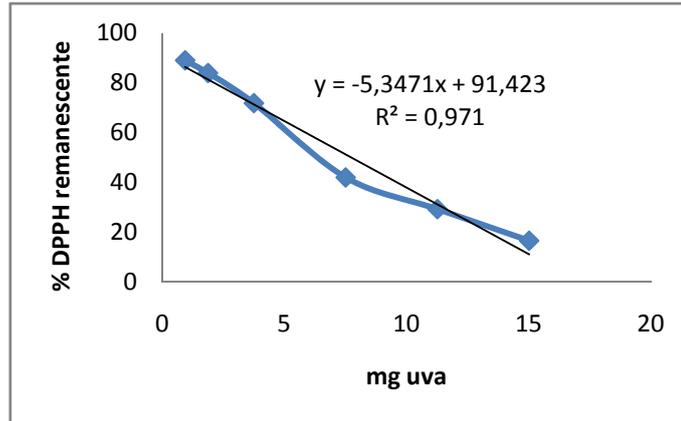


GRAFICO 13 – COMPORTAMENTO CINÉTICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A FRIO UTILIZANDO A METODOLOGIA DO DPPH

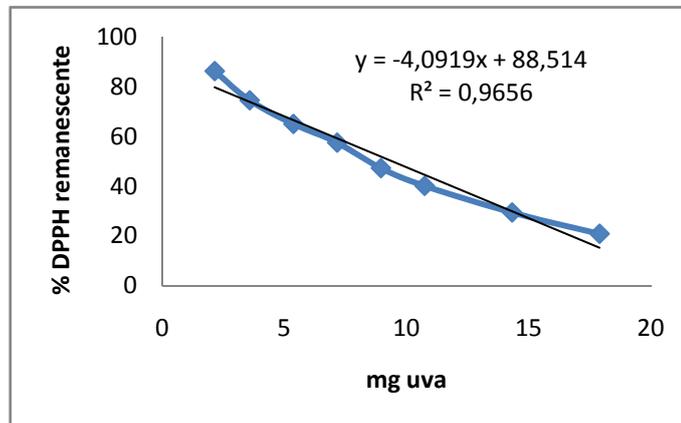


GRAFICO 14 – COMPORTAMENTO CINÉTICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A QUENTE NA METODOLOGIA DO DPPH

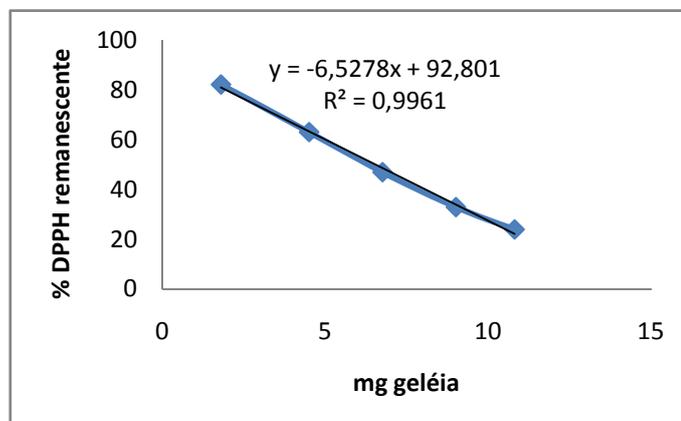


GRAFICO 15 – COMPORTAMENTO CINÉTICO DA GELÉIA DE UVA UTILIZANDO A METODOLOGIA DO DPPH

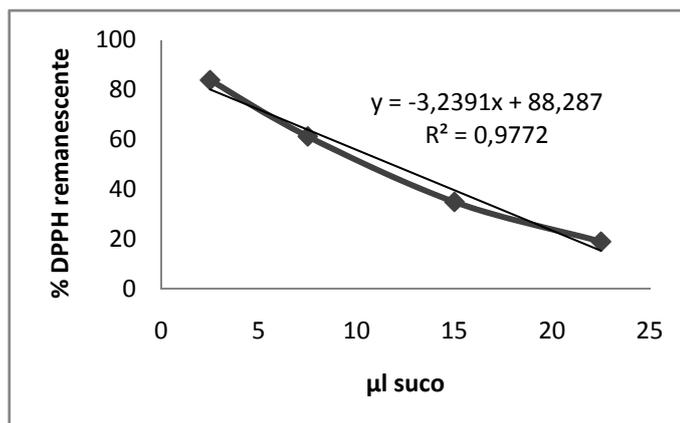


GRAFICO 16 – COMPORTAMENTO CINÉTICO DO SUCO DE UVA UTILIZANDO A METODOLOGIA DO DPPH

4.2.2 Método ABTS

A leitura da absorbância do ABTS pode ser realizada entre um e sete minutos segundo Kuskoski *et al.* (2005). Neste trabalho foi feita em sete minutos, pois para Sellappan, Akoh e Krewer (2002) é o tempo de leitura para compostos puros, extratos de plantas e de alimentos.

A coloração do ABTS é azul esverdeada como pode ser visto na figura 4. Quando a reação ocorre na ausência de pigmentos, como no caso dos padrões, o líquido passa do azul esverdeado forte para praticamente transparente. Como a uva apresenta pigmentos, a coloração final ficou levemente amarelada.



FIGURA 4 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A FRIO PELO MÉTODO ABTS

A solução de ABTS deve ser usada entre 12 e 16 horas. Após esse período começa um decaimento acentuado da absorbância da solução dificultando a análise, pois essa metodologia se baseia na queda da absorbância devido à presença de antioxidantes. Nos gráficos 17 e 18, estão as curvas para obtenção da equação de reta para cálculo do EC₅₀ dos padrões trolox e ácido ascórbico.

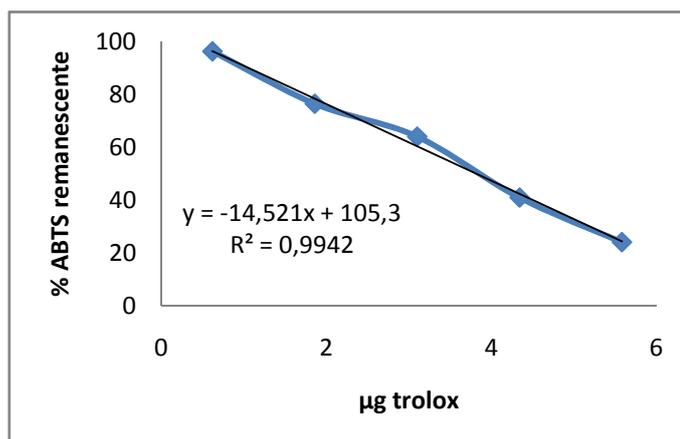


GRAFICO 17 – EQUAÇÃO DE RETA ESTABELECIDA PARA O CÁLCULO DO EC₅₀ E TEAC PELO MÉTODO ABTS

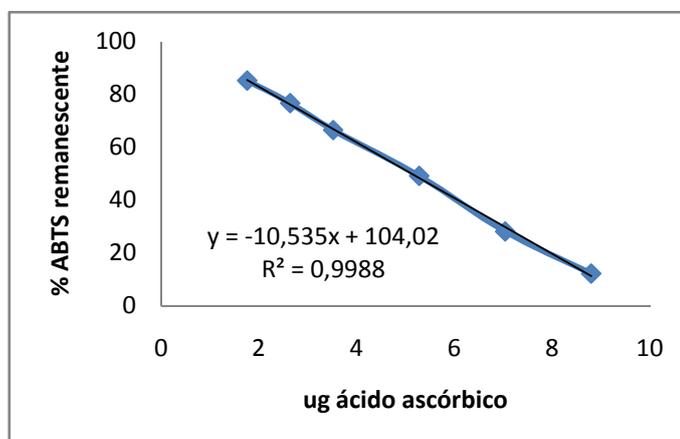


GRAFICO 18 – EQUAÇÃO DE RETA ESTABELECIDA PARA O CÁLCULO DO EC₅₀ E VCEAC PELO MÉTODO ABTS

Nos gráficos 19, 20, 21, 22 e 23 estão as retas e suas equações utilizadas para calcular o EC₅₀ dos extratos, do suco e da geléia na metodologia do ABTS.

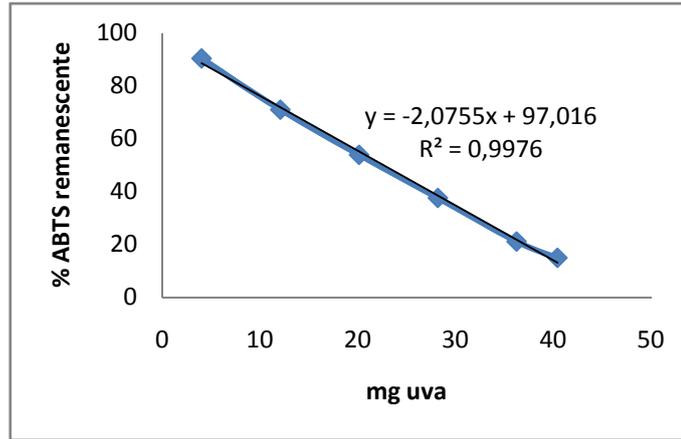


GRAFICO 19 – COMPORTAMENTO CINÉTICO DO EXTRATO AQUOSO UTILIZANDO A METODOLOGIA DO ABTS

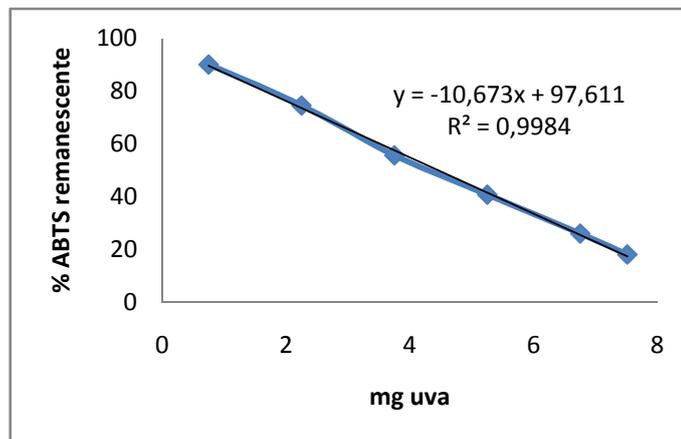


GRAFICO 20 – COMPORTAMENTO CINÉTICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A FRIO UTILIZANDO A METODOLOGIA DO ABTS

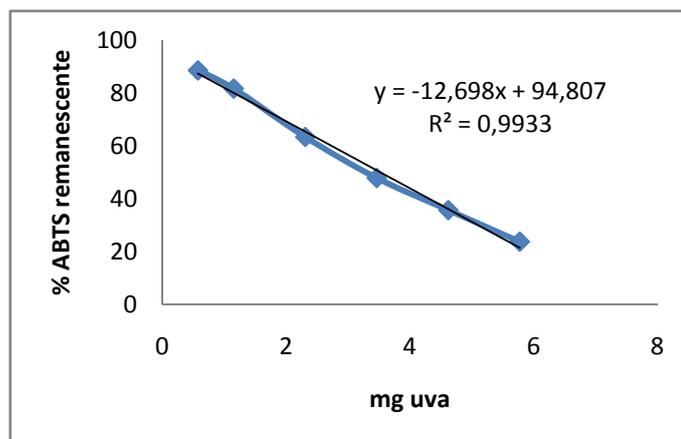


GRAFICO 21 – COMPORTAMENTO CINÉTICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A QUENTE UTILIZANDO A METODOLOGIA DO ABTS

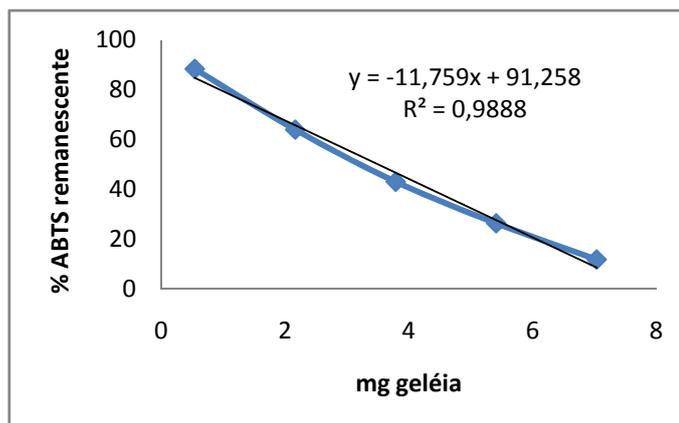


GRAFICO 22 – COMPORTAMENTO CINÉTICO DA GELÉIA DE UVA UTILIZANDO A METODOLOGIA DO ABTS

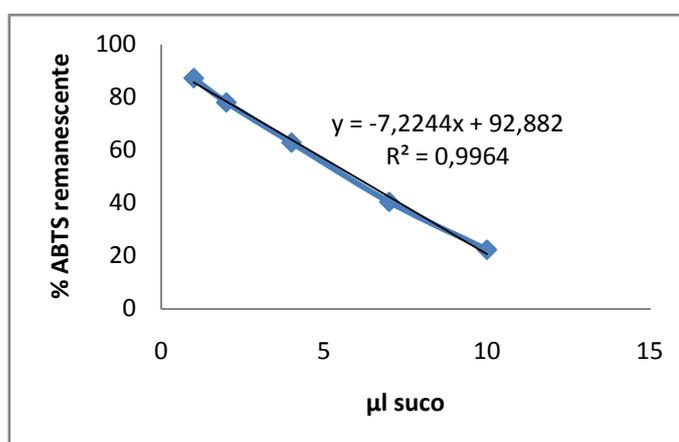


GRAFICO 23 – COMPORTAMENTO CINÉTICO DO SUCO DE UVA UTILIZANDO A METODOLOGIA DO ABTS

4.2.3 TEAC e VCEAC

Estão expressos na tabela 4 os resultados da avaliação da capacidade antioxidante em TEAC tanto utilizando a metodologia DPPH quanto ABTS para os extratos e produtos elaborados. O extrato hidroalcoólico a frio apresentou o maior valor de TEAC (6,1µmol/g de uva) na metodologia do DPPH e o extrato hidroalcoólico a quente o maior valor (4,312µmol/g de uva) para a metodologia do ABTS. Já o extrato aquoso apresentou os valores mais baixos de TEAC, 1,494 e 0,672µmol/g de uva, para o DPPH e ABTS respectivamente.

O TEAC reflete a capacidade do trolox inativar radicais livres com carga positiva como o ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABST⁺⁺) ao doar um hidrogênio (MAMEDE; PASTORE, 2004).

TABELA 4 – VALORES DE TEAC UTILIZANDO O MÉTODO DPPH E ABTS PARA OS EXTRATOS E PRODUTOS ELABORADOS

	TEAC ($\mu\text{mol/g}$ de uva)	
	DPPH	ABTS
Aquoso	1,494 \pm 0,017 ^{Ea}	0,672 \pm 0,010 ^{Eb}
Hidroalcoólico a frio	6,100 \pm 0,107 ^{Aa}	3,412 \pm 0,048 ^{Bb}
Hidroalcoólico a quente	5,022 \pm 0,120 ^{Ba}	4,312 \pm 0,063 ^{Ab}
Geléia	2,856 \pm 0,015 ^{Da}	1,717 \pm 0,017 ^{Db}
Suco	3,220 \pm 0,018 ^{Ca}	2,122 \pm 0,009 ^{Cb}

As médias seguidas pela mesma letra (minúscula na horizontal, maiúscula na vertical) não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A metodologia do DPPH apresentou valores de TEAC superiores aos valores encontrados na metodologia do ABTS. No trabalho de Soares *et al.* (2008) foi analisada a atividade antioxidante de casca de uvas Niágara e Isabel, também foram observados valores mais elevados em todos os resultados para o DPPH em relação aos resultados obtidos com o ABTS.

Munõs-Espada *et al.* (2004) avaliaram as cultivares de *Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*, e observaram uma associação positiva entre o conteúdo de antocianinas e a capacidade antioxidante pelo método de seqüestro de radicais livres do DPPH. Já, Kallithraka *et al.* (2005), não encontraram correlação estatisticamente significativa avaliando antocianinas totais e capacidade antioxidante em cultivares de *Vitis vinifera*, corroborando para a influência de outros constituintes da fruta.

A capacidade antioxidante expressa em TEAC pelo método DPPH encontrada por Abe *et al.* (2007) para diferentes variedades de uva compreendeu-se entre 2,7 e 19 $\mu\text{mol/g}$ de amostra. Os valores encontrados para as duas espécies de Niágara Rosada foram de 7,6 $\mu\text{mol/g}$ de amostra, valores próximos aos encontrados nos dois extratos hidroalcoólicos desse trabalho e da geléia elaborada.

Os resultados de TEAC para a polpa de uva obtida por Kuskoski *et al.* (2005), 8,5 e 9,2 μmol de trolox/g peso de polpa no método DPPH e ABTS respectivamente, foram superiores aos obtidos nos extratos e produtos, ficando próximo ao valor da geléia para o DPPH.

Os valores de VCEAC dos extratos, da geléia e do suco estão expressos na tabela 5, quando se emprega os métodos DPPH e ABTS. Observou-se novamente menores valores de VCEAC para o extrato aquoso nas duas metodologias de determinação da capacidade antioxidante. Os resultados mais elevados foram

obtidos com o hidroalcoólico a frio para o DPPH (99,467mg/100g de uva) e com o hidroalcoólico a quente para o ABTS (145,298mg/100g de uva).

TABELA 5 – VALORES DE VCEAC UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS PARA OS EXTRATOS E PRODUTOS ELABORADOS

	VCEAC mg/100g uva	
	DPPH	ABTS
Aquoso	24,36±0,285 ^{Ea}	22,64±0,348 ^{Eb}
Hidroalcoólico a frio	99,47±1,748 ^{Aa}	114,96±1,624 ^{Bb}
Hidroalcoólico a quente	81,89±1,950 ^{Ba}	145,30±2,129 ^{Ab}
Geléia	46,57±0,245 ^{Da}	57,87±0,566 ^{Db}
Suco	52,50±0,286 ^{Ca}	71,50±0,290 ^{Cb}

As médias seguidas pela mesma letra (minúscula na horizontal, maiúscula na vertical) não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Diferentemente dos resultados de TEAC, no VCEAC, foram encontrados resultados mais elevados na metodologia do ABTS, com exceção do extrato aquoso que apresentou valor maior para o DPPH, mas com uma pequena diferença, 24,358 e 22,642mg/100g de uva, nos métodos DPPH e ABTS respectivamente.

A atividade antioxidante de frutas e geléias está diretamente relacionada ao conteúdo de compostos fenólicos e estes compostos podem ser degradados por fatores físico-químicos comuns ao processamento de alimentos (DÁVALOS, BARTOLOMÉ, GÓMEZ-CORDOVÉS, 2005; RUBERTO, 2007).

Para que as propriedades dos compostos antioxidantes sejam asseguradas, o tecido das frutas deve estar livre de lesão e os produtos manufaturados devem ser armazenados ao abrigo da luz. Os antioxidantes são sensíveis à luz em razão das suas duplas ligações conjugadas (MAMEDE; PASTORE, 2004).

A atividade antioxidante nos produtos que foram triturados pode ter sido favorecida devido à presença de flavonóis na semente. Meyer *et al.* (1997) avaliaram o conteúdo de flavanóis, no experimento com uvas da variedade *Cabernet Sauvignon* e não detectaram flavanóis nos grãos analisados que tiveram as sementes removidas. Já os grãos analisados com as sementes apresentaram cerca de 33mg/100g de flavanóis. Na variedade *Petit Sirah*, os valores observados foram 1,47 e 23,3mg/100g, respectivamente, para uvas sem e com as sementes.

Alguns estudos *in vitro* mostraram que a atividade antioxidante dos flavonóides é maior que a das vitaminas E e C (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; RICE-EVANS *et al.*, 1995).

Nas análises realizadas observou-se correlação entre os métodos ABTS e DPPH ($R^2 = 0,8203$). Foi observada correlação também entre a atividade antioxidante pelo método ABTS e os fenólicos totais, mas com um coeficiente inferior ($R^2 = 0,7572$). O coeficiente de correlação dos fenólicos totais com o método DPPH foi $R^2 = 0,5406$. Não foi observada correlação da atividade antioxidante com a quantidade de antocianinas totais.

Abe *et al.* (2007) encontraram maior correlação entre as antocianinas totais e a capacidade antioxidante em comparação aos fenólicos totais e a capacidade antioxidante.

A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos está diretamente ligada à sua estrutura química, a qual pode estabilizar radicais livres. Esses participam de processos degenerativos celulares que provocam a aterosclerose, câncer e outras doenças (MAMEDE; PASTORE, 2004).

Hassimoto, Genovese e Lajolo (2005), avaliando a capacidade antioxidante de frutas, vegetais e polpas de frutas, observaram maior capacidade antioxidante em amostras contendo antocianinas, tanto pelo método do β -caroteno quanto pelo método do lipossomo.

4.2.3.1 Efeito dos processos de extração

Os extratos aquoso e hidroalcoólico a frio foram elaborados a partir de três processos de extração. Uma alíquota de cada processo foi separada para que pudesse ser feita a análise da capacidade antioxidante de cada etapa.

Nas etapas de extração para elaboração do extrato aquoso observou-se que o resíduo que iria para a nova etapa de extração não apresentava alteração em sua cor. O resíduo final apresentava-se ainda com coloração roxa escura.

Os valores de TEAC obtidos com o extrato aquoso tanto pelo método do DPPH e ABTS estão expressos na tabela 6.

TABELA 6 – COMPARAÇÃO DO TEAC DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS

	TEAC $\mu\text{mol/g}$ de uva	
	DPPH	ABTS
Aquoso 1ª extração	0,792 \pm 0,011 ^a	1,240 \pm 0,011 ^b
Aquoso 2ª extração	0,281 \pm 0,004 ^a	0,277 \pm 0,004 ^a
Aquoso 3ª extração	0,134 \pm 0,002 ^a	0,115 \pm 0,001 ^b

As médias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos com o DPPH foram decrescentes, sendo uma maior quantidade extraída no primeiro processo. Já na metodologia do ABTS o primeiro processo de extração apresentou elevada atividade antioxidante em relação aos outros dois processos.

Não houve diferença estatística ao nível de 5% entre os valores de TEAC obtidos nas duas metodologias empregadas, DPPH e ABTS, no segundo processo de extração para o extrato aquoso.

No gráfico 24 é possível observar a porcentagem extraída em cada um dos processos. No DPPH a primeira extração obteve cerca de 66% de atividade antioxidante e no ABTS a primeira obteve 76%, mas após três processos ainda se observa até 11% de atividade antioxidante.

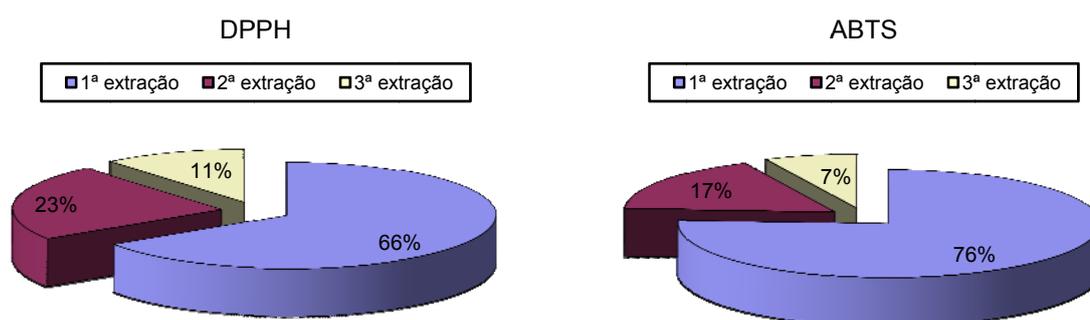


GRÁFICO 24 – COMPARAÇÃO DE EXTRAÇÃO DE CADA ETAPA DO EXTRATO AQUOSO UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS

Os valores de VCEAC do extrato aquoso estão expressos na tabela 7. Observam-se valores superiores de VCEAC nos processos de extração pelo método do ABTS.

TABELA 7 – COMPARAÇÃO DO VCEAC DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS

	VCEAC $\mu\text{mol}/100\text{g}$ de uva	
	DPPH	ABTS
Aquoso 1ª extração	13,67 \pm 0,195 ^a	41,78 \pm 0,375 ^b
Aquoso 2ª extração	4,58 \pm 0,058 ^a	9,33 \pm 0,128 ^b
Aquoso 3ª extração	2,18 \pm 0,026 ^a	3,89 \pm 0,045 ^b

As médias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No gráfico 25 é possível comparar as porcentagens correspondentes de VCEAC do extrato aquoso pelo método do DPPH e ABTS.

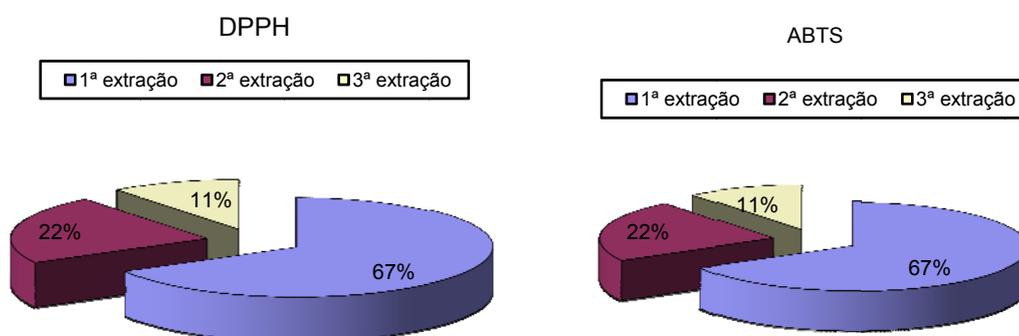


GRÁFICO 25 – COMPARAÇÃO DE EXTRAÇÃO EM CADA ETAPA DO EXTRATO AQUOSO UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS

Na tabela 8 estão os valores de TEAC obtidos para os processos de extração do extrato hidroalcoólico a frio.

TABELA 8 – COMPARAÇÃO DO TEAC DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A FRIO UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS

	TEAC $\mu\text{mol}/\text{g}$ de uva	
	DPPH	ABTS
Hidroalcoólico a frio 1ª extração	4,741 \pm 0,048 ^a	3,318 \pm 0,058 ^b
Hidroalcoólico a frio 2ª extração	0,704 \pm 0,016 ^a	0,455 \pm 0,006 ^b
Hidroalcoólico a frio 3ª extração	0,069 \pm 0,001 ^a	0,120 \pm 0,000 ^b

As médias seguidas pela mesma letra na horizontal não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A segunda e a terceira extração do hidroalcoólico a frio apresentaram valores muito baixos quando comparados à primeira extração, mas tiveram contribuição na atividade antioxidante total do extrato.

No gráfico 26 é possível observar a porcentagem dos valores de TEAC extraídos em cada processo. Os valores de cada processo de extração corresponderam a porcentagens semelhantes para os dois métodos empregados.

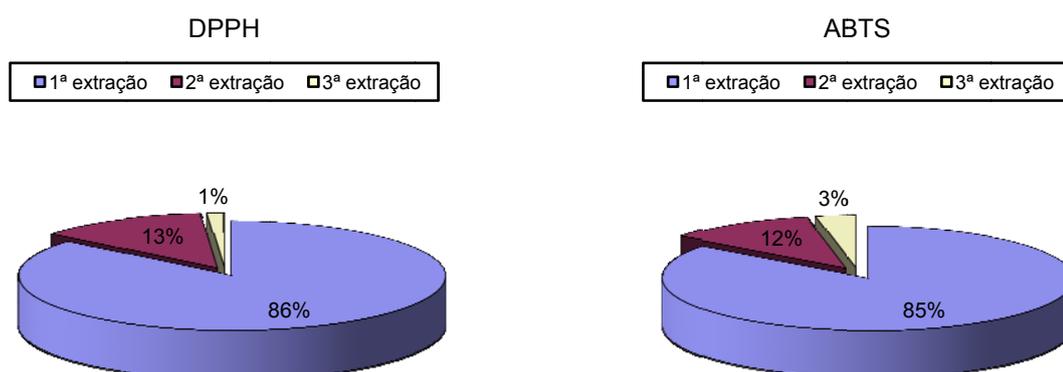


GRÁFICO 26 – COMPARAÇÃO DOS VALORES DE TEAC DE CADA ETAPA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A FRIO UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS

Nos processos de extração para elaboração do extrato hidroalcoólico a frio diferentemente do observado no extrato aquoso, observou-se que a cada processo o resíduo que iria para a nova etapa de extração apresentava-se cada vez com menos cor, representando que os pigmentos estavam sendo extraídos, o resíduo final apresentou uma coloração bege acinzentado.

Os valores expressos em VCEAC para o extrato hidroalcoólico a frio estão descritos na 9.

TABELA 9 – COMPARAÇÃO DO VCEAC DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A FRIO UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS

	VCEAC $\mu\text{mol}/100\text{g}$ de uva	
	DPPH	ABTS
Hidroalcoólico a frio 1ª extração	85,67 \pm 0,869 ^a	111,81 \pm 1,968 ^b
Hidroalcoólico a frio 2ª extração	11,48 \pm 0,257 ^a	15,33 \pm 0,197 ^b
Hidroalcoólico a frio 3ª extração	1,12 \pm 0,017 ^a	4,03 \pm 0,015 ^b

As médias seguidas pela mesma letra na horizontal, não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Observa-se uma contribuição da segunda extração na atividade antioxidante total expressa em VCEAC do extrato hidroalcoólico a frio.

Considerando apenas as extrações de cada processo como sendo 100% da atividade antioxidante do extrato, é possível verificar a contribuição de cada etapa no gráfico 31. Dessa forma foi extraído mais de 85% da atividade antioxidante expressa em VCEAC no primeiro processo.

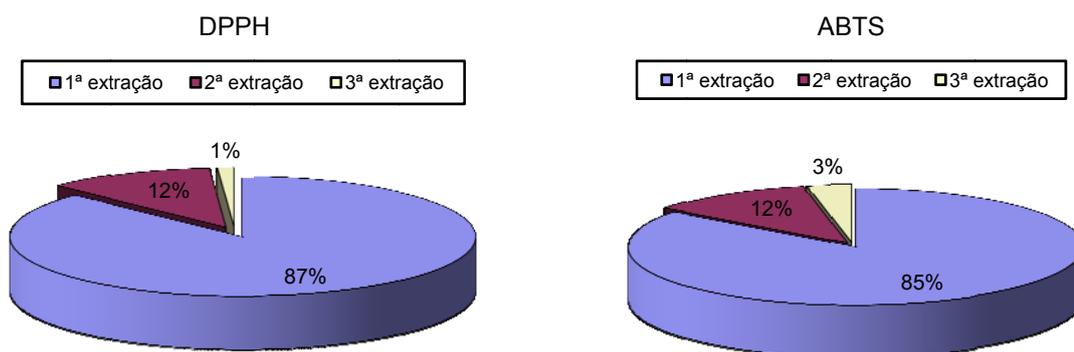


GRÁFICO 27 – COMPARAÇÃO DE CADA ETAPA DE EXTRAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A FRIO UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS

Quando se comparam os dois métodos de extração, hidroalcoólico a frio e aquoso, observa-se que são necessárias extrações adicionais subseqüentes para retirada de compostos responsáveis pela atividade antioxidante. Sendo necessário para o extrato aquoso mais que três etapas para extração dos compostos antioxidantes já que o resíduo da terceira extração ainda apresentava até 11% de atividade antioxidante. O extrato hidroalcoólico a frio apresentou em sua última extração no máximo 3% de atividade antioxidante.

4.2.3.2 Sucos comerciais

Foi realizada comparação da atividade antioxidante do suco preparado no laboratório e de três sucos comerciais. Os resultados desta comparação estão descritos na tabela 10. Teve-se o cuidado de adquirir sucos comerciais com a data de fabricação próximas a data de elaboração do suco em laboratório para aumentar a possibilidade do mesmo período de colheita.

O suco A era integral, sem adição de açúcar e com adição de dois conservantes, sorbato de potássio e dióxido de enxofre. O suco B foi o elaborado em laboratório, sem adição de açúcar ou conservantes. O suco C era pronto para beber, adoçado e sem conservantes. O suco D também era pronto para beber, adoçado e com adição de acidulante ácido cítrico, aroma idêntico ao natural de uva, antioxidante (ácido ascórbico) e antiespumante.

TABELA 10 – COMPARAÇÃO DO TEAC DO SUCO ELABORADO NO LABORATÓRIO COM OS SUCOS COMERCIAIS UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS

	TEAC $\mu\text{mol/ml}$ de suco	
	DPPH	ABTS
Suco A	8,303 \pm 0,202 ^{Aa}	3,299 \pm 0,045 ^{Ab}
Suco B	4,012 \pm 0,022 ^{Ba}	2,644 \pm 0,011 ^{Bb}
Suco C	4,210 \pm 0,037 ^{Ba}	1,420 \pm 0,014 ^{Cb}
Suco D	3,222 \pm 0,062 ^{Ca}	1,145 \pm 0,006 ^{Db}

As médias seguidas pela mesma letra (minúscula na horizontal, maiúscula na vertical) não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Observou-se novamente que foram obtidos valores mais elevados de TEAC na metodologia do DPPH em relação à metodologia do ABTS. Nas duas metodologias os resultados foram superiores para o suco A, 8,303 e 3,299 $\mu\text{mol/ml}$ de suco para o DPPH e ABTS respectivamente. Os menores valores de TEAC foram obtidos com o suco D: 3,222 e 1,145 $\mu\text{mol/ml}$ de suco para o DPPH e ABTS respectivamente. Deve-se ressaltar que o sorbato de potássio e o dióxido de enxofre também são utilizados como antioxidantes, favorecendo a elevada resposta na atividade antioxidante do suco A.

Na Tabela 11 estão descritos os resultados de VCEAC dos sucos comerciais e do suco de laboratório. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}/200\text{ml}$ de suco devido a 200ml ser o padrão de medida de um copo de suco.

O suco A apresentou novamente atividade antioxidante mais alta tanto na metodologia do DPPH (271mg/200ml de suco) quanto na metodologia do ABTS (222mg/200ml de suco). Os resultados de VCEAC foram mais elevados no DPPH, com exceção do suco de laboratório que apresentou atividade antioxidante superior na metodologia do ABTS. O suco que apresentou atividade antioxidante inferior foi o suco D, 105 e 77mg/200ml de suco, para o DPPH e ABTS respectivamente.

TABELA 11 – COMPARAÇÃO DO VCEAC DO SUCO ELABORADO NO LABORATÓRIO COM OS SUCOS COMERCIAIS UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS

	VCEAC mg/200 ml de suco	
	DPPH	ABTS
Suco A	270,8±6,595 ^{Aa}	222,4±3,039 ^{Ab}
Suco B	130,8±0,713 ^{Ba}	178,2±0,722 ^{Bb}
Suco C	137,3±1,208 ^{Ba}	95,7±0,913 ^{Cb}
Suco D	105,1±2,006 ^{Ca}	77,1±0,429 ^{Db}

As médias seguidas pela mesma letra (minúscula na horizontal, maiúscula na vertical) não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Em análise realizada por Falcão *et al.* (2007) em sistema modelo de geléia os valores de TEAC encontrados também foram superiores com a metodologia ABTS em relação à metodologia DPPH.

No método do DPPH, o suco elaborado em laboratório não apresentou diferença estatística a nível de 5% de probabilidade do suco C, tanto quando os resultados foram expressos em TEAC quanto em VCEAC. Já pelo método do ABTS o suco de laboratório apresentou atividade antioxidante superior, sendo 86% mais alta quando expressos das duas formas, TEAC e VCEAC. O suco C era o que mais se aproximava do suco B em sua composição, pois não tinha adição de conservantes. A diferença apresentada pelo método ABTS pode ser devida à elaboração do suco em laboratório ser realizada sob condições brandas.

Mesmo o suco D tendo em sua composição a adição de ácido ascórbico, apresentou atividade antioxidante inferior nos dois métodos testados. É possível ressaltar a elevada atividade antioxidante do suco B, pois apresentou o segundo valor mais alto em cada metodologia, mas o suco A deve parte de sua atividade antioxidante aos conservantes adicionados.

4.2.3.3 Armazenamento suco

Foi realizado um comparativo da atividade antioxidante do 6º, 9º e 12º mês de armazenamento do suco de uva elaborado no laboratório. Os resultados de TEAC podem ser observados na tabela 12.

Observa-se que o valor da atividade antioxidante expressa em TEAC foi superior no 9º mês, mas após 12 meses o valor foi muito próximo ao inicial. O mesmo aconteceu com os valores de VCEAC, expressos na tabela 13. Isso pode ter

acontecido devido à forma de coleta realizada. O suco extraído era imediatamente coletado em garrafas e armazenado, sem realizar uma homogeneização de todas as coletas, para evitar a contaminação e diminuir o contato com o oxigênio. Não é possível saber a ordem de extração porque as garrafas não foram numeradas.

TABELA 12 – COMPARAÇÃO DOS VALORES DE TEAC DOS MESES DE ARMAZENAMENTO DO SUCO ELABORADO NO LABORATÓRIO UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS

	TEAC umol/ml de suco	
	DPPH	ABTS
6 meses	3,742±0,064 ^{Ca}	1,933±0,015 ^{Cb}
9 meses	4,445±0,018 ^{Aa}	3,303±0,043 ^{Ab}
12 meses	3,849±0,009 ^{Ba}	2,697±0,021 ^{Bb}
Média	4,012±0,022 ^a	2,644±0,010 ^b

As médias seguidas pela mesma letra (minúscula na horizontal, maiúscula na vertical) não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Ou *et al.* (2002), em um estudo comparativo, avaliaram diferentes métodos de determinação da atividade antioxidante e observaram resultados discrepantes. Cataneo *et al.* (2008) encontraram valores de TEAC para bagaço de uva Couderc utilizando a metodologia do DPPH entre 122% a 171% superiores em relação aos obtidos com o ABTS. Quando a análise foi realizada com bagaço de uva Pinot Gris os valores do DPPH se mantiveram superiores, mas não chegaram a 8% em comparação aos obtidos com a metodologia ABTS. Os compostos presentes em cada variedade de uva influenciam na atividade antioxidante e favorecem para respostas diferentes de acordo com o método utilizado.

TABELA 13 – COMPARAÇÃO DOS VALORES DE VCEAC DOS MESES DE ARMAZENAMENTO DO SUCO ELABORADO NO LABORATÓRIO UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS

	VCEAC umol/200ml de suco	
	DPPH	ABTS
6 meses	122,047±2,073 ^{Ca}	130,267±1,049 ^{Cb}
9 meses	144,956±0,582 ^{Aa}	222,583±2,916 ^{Ab}
12 meses	125,546±0,304 ^{Ba}	181,759±1,429 ^{Bb}
Média	130,849±0,713 ^a	178,203±0,722 ^b

As médias seguidas pela mesma letra (minúscula na horizontal, maiúscula na vertical) não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O ABTS apresentou valores de VCEAC mais elevados que os apresentados na metodologia do DPPH, diferentemente do que aconteceu com os valores de

TEAC, que foram maiores para o DPPH. Esses valores superiores de VCEAC obtidos com a metodologia do ABTS foram observados também no extrato hidroalcoólico a frio, hidroalcoólico a quente, na geléia e em todas as frações dos extratos aquoso e hidroalcoólico, o que pode sugerir que o fator determinante possa ser a composição da própria uva.

4.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

O extrato analisado foi o hidroalcoólico a frio, diluído em fase diluente, sem passar por nenhum processo de purificação anterior.

O extrato hidroalcoólico a frio apresentou baixa absorção devido à baixa quantidade de compostos presentes na amostra analisada. A absorção teve que ser reduzida a 40-50mAU para que os compostos fossem detectáveis. Como a amostra não foi purificada havia grande quantidade de açúcares presentes.

Na figura 5 é possível verificar na imagem os dois compostos que estavam presentes em maior quantidade, sendo, o primeiro, com o tempo de 30 minutos com centro vermelho, que se apresentou em maior quantidade. Na figura 6 está o fingerprint do extrato hidroalcoólico, mostrando os tempos de retenção dos compostos fenólicos. Na figura 7 é possível visualizar o comprimento de onda da substância em 30,14 minutos correspondendo a delfinidina 3-O-rutinosídeo.

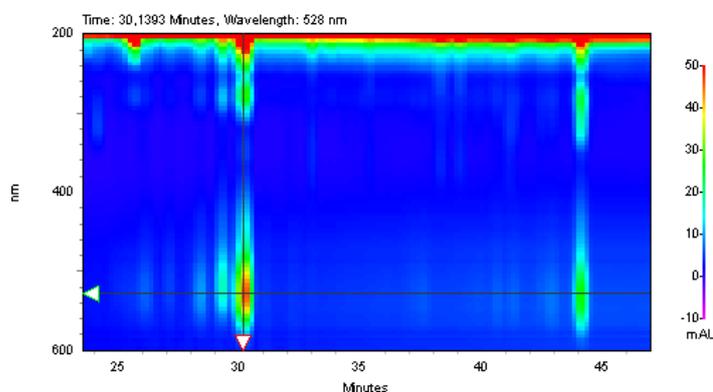


FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA NO UV PRESENTES NO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA UVA

O maior pico do extrato analisado coincidiu com o tempo do maior pico do extrato bruto de uva CHR Hansen[®], em uma cromatografia realizada por

Kuskoski (2000). Os compostos presentes em maior concentração no extrato bruto analisado por Kuskoski apresentaram tempo de retenção entre 30 e 40 minutos, tendo posteriormente mais três picos pequenos até 48,8 minutos.

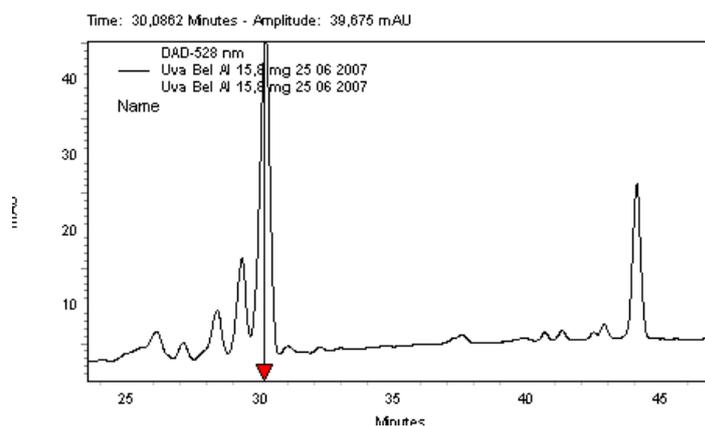


FIGURA 6 – FINGERPRINT DOS COMPOSTOS PRESENTES NO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA UVA

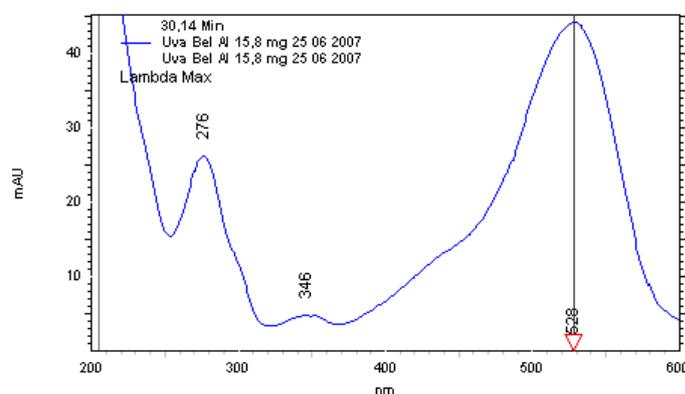


FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA DO COMPOSTO PRESENTE EM MAIOR CONCENTRAÇÃO NO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA UVA

De acordo com Goiffon, Brun e Bourrier (1991) e Lee e Hong (1992) é provável que o composto presente em maior concentração seja a delfinidina 3-O-rutinosídeo (524nm). O comprimento de onda do extrato analisado foi 528nm, muito próximo do descritos pelos autores.

Goldy, Ballinger e Maness (1986) verificaram a presença de 31 antocianinas diferentes em uvas da espécie *Vitis labrusca* (variedade Concord). Desse total, apenas 12 foram completamente caracterizadas pelos autores: 3-glicosídeo e 3,5-diglicosídeo de cianidina, 3-glicosídeo e 3,5-diglicosídeo de peonidina, 3-glicosídeo e 3,5-diglicosídeo de delphinidina, 3-glicosídeo e 3,5-diglicosídeo de petunidina, 3-glicosídeo e 3,5-diglicosídeo de malvidina, 3-acetilglicosídeo de malvidina e 3-pcumarilglicosídeo de malvidina. A cultivar analisada nesse trabalho foi a Isabel, podendo apresentar compostos diferentes aos verificados na cultivar Concord.

Abe *et al.* (2007) detectaram a presença da antocianina delphinidina em duas cultivares diferentes, uma da variedade *Vitis labrusca*, folha de figo, e outra da *Vitis vinifera*, cultivar Syrah. A cv. Isabel é da variedade *Vitis labrusca*.

Para efeito dessa dissertação a quantificação não foi possível devido à falta do padrão para análise e comparação.

5 CONCLUSÃO

A extração hidroalcoólica favoreceu a extração dos compostos fenólicos, mas a utilização de altas temperaturas favoreceu a destruição de grande parte das antocianinas.

A extração com etanol também favoreceu a elevada atividade antioxidante, sendo o extrato hidroalcoólico a quente o que apresentou atividade antioxidante mais elevada para o método do DPPH e o extrato hidroalcoólico a frio para o método ABTS. O extrato aquoso apresentou a atividade antioxidante menos expressiva nas duas metodologias.

Obteve-se boa correlação entre os métodos utilizados para determinação da atividade antioxidante, DPPH e ABTS.

O processamento diminuiu a capacidade antioxidante da uva, a quantidade de fenólicos totais e de antocianinas totais.

Entre os produtos, o suco apresentou os melhores resultados para a atividade antioxidante, fenólicos totais e antocianinas totais.

O suco elaborado em laboratório apresentou elevada atividade antioxidante em comparação aos sucos comerciais, apresentando-se abaixo apenas de um suco concentrado que tinha como aditivo um composto com atividade antioxidante.

O armazenamento não alterou a atividade antioxidante do suco de uva.

Avaliando os resultados verifica-se a importância de estudos complementares para determinar a influência de outras formas de processamento na atividade antioxidante de alimentos, assim como a identificação dos compostos mais afetados, empregando-se técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas.

REFERÊNCIAS

- ABE, L. T. *et al.* Compostos Fenólico e Capacidade Antioxidante de Uvas *Vitis labrusca* e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 394-400, 2007.
- ALONSO, A. M. *et al.* Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50 n. 21, p. 5832-5836, 2002.
- ALVARENGA, L. R.; ABRAHÃO, E. Escolha de cultivares na viticultura. **Informe Agropecuário**, v. 10, n. 117, p. 15-21, set. 1984.
- ALVES, A. O. **Presença de trans-resveratrol em geléias de uva e sua relação com a radiação UV**. 142 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.
- AMAKURA, Y. *et al.* Influence of jam processing on the radical scavenging activity and phenolic content in berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 12, p. 6292-6297, 2000.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, v. 350, n. 1, p. 103-108, 1996.
- AQUARONE, E. *et al.* **Biotechnologia industrial**. São Paulo: Blucher, 2001. 523p.
- ARBOS, K. A. **Estudo do potencial antioxidante de vegetais da família *Cruciferae* de diferentes cultivos**. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Setor de ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná:Curitiba, 2004.
- ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.
- ARUOMA, O. I. *et al.* Characterization of food antioxidants, illustrated using commercial garlic and ginger preparations. **Food Chemistry**, v. 60, n. 2, p. 149-156, 1997.
- ARUOMA, O. I. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. **Journal of American Oil Chemists Society**, v. 75, n. 2, p. 199–212, 1998.
- AWIKA, J. M. *et al.* Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6657-6662, 2003.
- BAGGIO, J. **Avaliação dos resíduos (casca e pó orgânico) de café (cofeea arabica l.) como provável fonte de substâncias bioativas**. 77 f. Dissertação

(Mestrado em Ciência de Alimentos) - Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BITSCH, R. Pflanzenphenole und ihre gesundheitliche Wirkung. **Naturwissenschaftliche Rundschau**, v. 49, n. 2, p. 47-51, 1996.

BLOIS, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1200, 1958.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2001. p. 103-118.

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

BRENNA, O. V; PAGLIARINI, E. Multivariate analysis of antioxidant power and polyphenolic composition in red wine. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 49, n. 10, p. 4841-4844, 2001.

CADAHÍA, E. *et al.* Changes in tannic composition of reproduction cork *Quercus suber* throughout industrial processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 6, p.2332-2336, 1998.

CAMARGO, H. A. **Porta enxertos e cultivares** – Sistema de Produção 2. Versão eletrônica, janeiro/2003. Uvas Americanas e Híbridas para Processamento em Clima Temperado. Embrapa uva e vinho, 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvaAmericanaHibridaClimaTemperado/index.htm>> Acesso em: 20/03/2007.

CAO, G.; PRIOR, R. L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 1309-1315, 1998.

CATANEO, C. B. *et al.* Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 93-102, 2008.

CATI – SP. **Produção integrada da uva**. Versão eletrônica, junho/2000. Disponível em: <http://www.cati.sp.gov.br/novacati/projetos/pif/uva/aspectos_economicos.htm> Acesso em: 18/05/2008.

Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. **CNNPA nº 12: padrões de identidade e qualidade para os alimentos**. São Paulo, 1978. Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_78_geleia.htm>. Acesso em: 13/04/2008.

CONDE, E. *et al.* Polyphenolic composition of *Quercus súber* cork from different spanish provenances. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 3166-3171, 1998.

CRUESS, W. V.. **Produtos Industriais de Frutas e Hortaliças**: Livro texto para estudantes, pesquisadores e industriais, Edgard Blücher, São Paulo, 1973.

DÁVALOS, A.; BARTOLOMÉ, B.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. **Food Chemistry**, v. 93, n. 2, p. 325-330, 2005.

DECKER, E. A. Phenolics: Prooxidants or Antioxidants? **Nutrition Reviews**, v. 55, p. 396-407, 1997.

DI MAMBRO, V. M.; MARQUELE, F. D.; FONSECA, M. J. V. Avaliação *in vitro* da ação antioxidante em formulações antienvhecimento. **Cosmetics & Toiletries** (edição em português), v. 17, n. 4, p. 74-78, 2005.

ESPÍN, J. C. *et al.* Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 48, n. 5, p. 1588-1592, 2000.

FALCÃO, A. P. *et al.* Índice de polifenóis, antocianinas totais e atividade antioxidante de um sistema modelo de geléia de uvas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 637-642, 2007.

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

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

FRANKEL, E.N.; WATERHOUSE, A.L; TEISSEDRE, P.L., Principle phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoprotein. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 43, n. 4, p. 890-894, 1995.

FOLIN, C.; CIOCALTEAU, V. Tyrosine and tryptophan determination in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 73, p. 627-650, 1927.

FOTSIS, T. *et al.* Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and *in vitro* angiogenesis. **Cancer Research**, v. 57, n. 14, p. 2916-2921, 1997.

GIL, M. I. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 4581-4589, 2000.

GOIFFON, J. P.; BRUN, M.; BOURRIER, M. J. High-performance liquid chromatography of red fruit anthocyanins. **Journal of Chromatography**, v. 537, p. 101-121, 1991.

GOLDSCHMIDT, S.; RENN, K., **Chemische Berichte**, v. 55, p. 628-643, 1922.

GOLDY, R. G.; BALLINGER, W. E.; MANESS, E. P. Fruit anthocyanin content of some *Euvitis x Vitis rotundifolia* hybrids. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v. 111, p. 955-959, 1986.

HAGIWARA, A. *et al.* Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-16-phenylimidazol (4,5- b) pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. **Cancer Letters**, v. 171, p. 17-25, 2001.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

HAMID, A. A. *et al.* Characterisation of antioxidative activities of various extracts of *Centella asiatica* (L) Urban. **Food Chemistry**, v. 77, p. 465-469, 2002.

HASSIMOTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 2928-2935, 2005.

HERRMANN, K. Pflanzlichen Lebensmitteln vorkommende Flavonoide als **Antioxidantien**. **Gordian**, v. 93, n. 7-8, p. 108-111, 1994.

HILLIS, W. E. *et. al.* Polyphenols of *Eucalyptus sideroxylon*. **Phytochemistry (Oxford)**, v. 13, n. 8, p. 1591-1595, 1974.

HORWITZ, W. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists**. A.O.A.C., 13. ed., [s.i. s.n], 1980.

HRAZDINA, G.; BORZEL, A. J.; ROBINSON, W. B. Studies on the stability of the anthocyanidin-3,5-diglucosides. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 21, p. 201-204, 1970.

HUTCHINGS, J. B. **Food Colour and Apperance**. In: Chemistry of Food Colour London: Blackie Academic, 1994.

IONITA, P. Is DPPH Stable Free Radical a Good Scavenger for Oxygen Active Species?. **Chemical Papers**, v. 59, n. 1, p. 11-16, 2005.

ITO, N. *et al.* Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 70, n.2, p. 343-347, 1983.

JACKMAN, R. L.; SMITH, J. L. Anthocyanins and betalains. In: HENDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J. D. (Eds.) **Natural Food Colorants**. 2 ed. Londres: Chapman & Hall, 1996. p. 245-309.

JACKMAN, R. L.; YADA, R. Y.; TUNG, M. A. A review: separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis. **Journal of Food Biochemistry**, v. 29, p. 279-308, 1987.

KALLITHRAKA, S. *et al.* Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.): association with antiradical activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, p. 375-386, 2005.

KAMEI, H. *et al.* Anti-tumor effect of methanol extracts from red and white wines. **Cancer Biotherapy and Radiopharmacology**, v. 13, p. 447-452, 1998.

KAPADIA, G. J. *et al.* Inhibition of 12 -O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced Epstein virus early antigen activation by natural colorants. **Cancer Letters**, n. 115, p. 173 -178, 1997.

KIM, D.-O.; JEONG, S.W.; LEE, C.Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, v. 81, p. 231-326, 2003.

KIM, S. Y. *et al.* Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grapes seed extracts. **Food Chemistry**, v. 97, n. 3, p. 472-479, 2006.

KIRALP, S.; TOPPARE L. Polyphenol content in selected Turkish wines, an alternative method of detection of phenolics. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 236-239, 2006.

KONG, J. M. *et al.* Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, p. 923-933, 2003.

KOVAC, V.; PEKIC, B. Proanthocyanidols from grape and wine. **Contemporary Agriculture**, v. 39, n. 4, p. 5-17, 1991.

KUSKOSKI, E. M. **Extração identificação e estabilidade de pigmentos dos frutos de baguaçu (*Eugenia umbelliflora*, BERG)**. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

KUSKOSKI, E. M. *et al.* Aplicación de Diversos Métodos Químicos para Determinar Actividad Antioxidante en Pulpa de Frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, 726-732, 2005.

LAI, L S.; CHOU, T.; CHAO, W. W. Studies on the antioxidative activities of Hsiantso (Mesona procumbens Hemsl) leaf gum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 963–968, 2001.

LANDRAULT, N. *et al.* Antioxidant capacities and phenolics levels of french wines from different varieties and vintages. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 3341-3348, 2001.

LANGCAKE, P. *et al.* Identification of pterostilbene as a phitoalexin of *Vitis vinifera* leaves. **Photochemistry**, v. 18, n. 6, p. 1025-1028, 1979.

LANGSETH, L. Oxidant, antioxidants and disease prevention. **JLSI Europe**, pp 4-13, 1995

LAPARRA, J.; MICHAUD, J.; MASQUELIER, J. Action of oligomeric procyanidins on vitamin C deficient guinea pig. **Bulletin de la Societe de Pharmacie de Bordeaux**, v. 118, n. 1-2, p. 7-13, 1979.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A. G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, v. 71, n. 2, p. 214-222, 2005.

LARSON, R. A. **Naturally Occurring Antioxidants**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1997.

LEAL, P. F. et al. Functional properties of spices extracts obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2520-2525, 2003.

LEÃO, P. C. S. & SOARES, J. M. **A Viticultura do Semi-Árido Brasileiro**, EMBRAPA Semi-Árido, Petrolina, 2000.

LEE, H. S.; HONG, V. Review: Chromatographic analysis of anthocyanins. **Journal of Chromatography**, v. 624, p. 221-234, 1992.

LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 5, p. 1269-1278, 2005.

LEE, J.; RENNAKER, C.; WROLSTAD, R. E. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. **Food Chemistry**, v. 110, p. 782-786, 2008.

MACHLIN, L. J. Introduction. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 669, n. 4, p. 1-6, 1992.

MALACRIDA, C. R. **Compostos fenólicos e alguns parâmetros físico-químicos em suco de uva**. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

MALACRIDA, C. R. e MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Boletim do CEPPA**, v. 24, n. 1, p. 59-82. 2006

MALIEN-AUBERT, C.; DANGLES, O.; AMIOT, M.J. Color stability of commercial anthocyanin - based extract in relation of the phenolic composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 170-176, 2001.

MAMEDE, M. E. O; PASTORE, G. M. Compostos Fenólicos Do Vinho: Estrutura e Ação Antioxidante. **Boletim do CEPPA**, v. 22, n. 2, p. 233-252. 2004

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

MAXCHEIX, J. J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. **The main phenolics of fruit**. In Fruit Phenolics; CRC Press: Boca Raton, FL, 1990; p. 1-98.

MAZZA, G.; MINIATI, E. **Anthocyanins in fruits, vegetables and grains**. Boca Raton: CRC Press, 1993. 362 p.

MEYER, A. S. *et al.* Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolics antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1638-1643, 1997.

MEYER, L. H. The Avi Publishing Company Inc. Fourth Printing. **Food Chemistry**, Michigan, p. 239-249, 1982.

MIELE, A. *et al.* Free amino acids in Brazilian grape juices. **Rivista di Viticoltura e di Enologia**, v. 43, n. 4, p. 15-21, 1990.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, p. 231-237, 2004.

MUÑOZ-ESPADA, A. C. *et al.* Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of Concord, Norton, and Marechal Foch Grapes and wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6779-6786, 2004.

OU, B. *et al.* Analysis of antioxidant activity of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 3122-3128, 2002.

OU, C., ZHANG, H. E MUKHERJEE, B. **Sub-Path Protection for Scalability and Fast Recovery in Optical WDM Mesh Network**. Em *Proc. OFC*, 2002.

PALAMIDIS, N.; MARKAKIS, P. Stability of grape anthocyanin in a carbonated beverage. **Journal of Food Science**, v. 40, p. 1047-1049, 1975.

PELLEGRINI, P. *et al.* Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 2812-2819, 2003.

PEYNAUD, E. **Connaissance et travail du vin**. 2. ed. Paris: Dunod, 1997.

PEYRAT-MAILLARD, M. N.; BONNELLY, S.; BERSET, C. Determination of antioxidant activity of phenolic compounds by coulometer detection. **Talanta**, v. 51, p. 709-716, 2000.

PIETTA, P.; SIMONETTI, P.; MAURI, P. Antioxidant activity of selected medicinal plants. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 4487-4490, 1998.

PIMENTEL, C. V. M.; FRANCKI, V. M.; GOLLUCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais: Introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo. Editora Varela, 2005.

PLESSI, M.; BERTELLI, D.; ALBASINI, A. Distribution of metals and phenolic compounds as a criterion to evaluate variety of berries and related jams. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 419-427, 2007.

POMMER, C. V. **Uva tecnologia de produção, pós colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003.

POOL-ZOBEL, B. L. *et al.* Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 9, p. 1847-1850, 1997.

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

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

PROTEGGENTE, A. R. *et al.* The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. **Free Radical Research**, v. 36, p. 217-233, 2002.

PUKALSKAS, A. *et al.* Identification of radical scavengers in sweet grass (*Hierochioe odorata*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, n. 50, p. 2914-2919, 2002.

RAYMUNDO, M. S. **Avaliação da Atividade Antioxidante in vitro em Extratos de Algas Marinhas**. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Alimentos). Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

REHMAN, Z.; HABIB, F.; SHAH, W. H. Utilization of potato peels extract as a natural antioxidant in soy bean oil. **Food Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 215-220, 2004.

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

RIBEIRO, E.T.S. **Emprego de Técnicas de Extração a Alta e Baixa Pressão para Obtenção de Polifenóis Antioxidantes do Subproduto Agroindustrial de Maçã.** 118 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

RICE-EVANS, C. *et al.* The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, v. 22, p. 375-383, 1995.

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

RIZZON, L. A.; MANROI, V.; MENEGUZZO, J. **Elaboração de suco de uva na Propriedade vinícola.** Bento Gonçalves: Embrapa-CNPV, 1998. 24p. (Documentos, 21).

RIZZON, L. A., MIELE, A., MENEGUZZO, J. Avaliação da uva cv. Isabel para a elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20 n. 1, p. 115-121, 2000.

ROE, D. A. Effects of drugs on vitamins needs. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 669, p. 156-163, 1992.

ROGINSK, Y. V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.

RUBERTO, G. *et al.* Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 203-210, 2007.

SALUNKHE, D. K.; CHAVAN, J.K.; KADAM, S.S. **Dietary Tannins: Consequences and Remedies**, **CRC Press**, Boca Raton, FL, 1989.

SALUNKHE, D. K.; KADAM, S. S.. **Handbook of fruit Science and Technology – Production, Composition, Storage and Processing**, New York, Marcel Decker , 1995.

SANTANA, M. T. A. *et al.* Caracterização de diferentes marcas de sucos de uva comercializados em duas regiões do Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 882-886, 2008.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown blueberries and blackberries. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 2432-2438, 2002.

SHAHIDI, F; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications.** Lancaster: Technomic Publishing Co, Inc., 1995.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P.K. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67- 103, 1992.

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

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.

SILVA, T. das G. **Diagnóstico vitivinícola do sul de Minas Gerais**. 196 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.

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

SOARES, M. *et al.* Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de Uvas Niágara e Isabel, **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 01, p. 059-064, 2008.

SOUTO, A. *et al.* Determination of *trans*-Resveratrol Concentrations in Brazilian Red Wines by HPLC. **Journal of Food Compositions and Analysis**. v. 14, p. 441-445, 2001.

STAVRIC, B. Antimutagens and anticarcinogens in foods. **Food Chemical Toxicology**, v. 32, n. 1, p. 79-90, 1994.

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**, v. 49, p. 4627–4634, 2001.

TRESSLER, D. K.; PEDERSON, C. S. Preservation of grape, 1936.

USSEGLIO-TOMASSET, L. **Chimie oenologique**. 2. ed. Paris: Lavoisier Technique et Documentation, 1995.

UVIBRA. União Brasileira de Vitivinicultura. **Produção de Uvas, Elaboração de Vinhos e Derivados**. Disponível em: <http://www.uvibra.com.br/pdf/safra_uva1998-2007.pdf>. Acesso em: 27/01/2008.

VELIOGLU, Y. S *et al.* Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4113-4117, 1998.

WANG, C. J. *et al.* Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hidroperoxideinduced hepatic toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 411-416, 2000.

WANG, S. Y.; LIN, H., S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 2, p. 140-146, 2000.

WATERS, M. D. *et al.* Activity profiles of antimutagens: *in vitro* and *in vivo* data. **Mutation Research**, v.350, n.1, p.109-129, 1996.

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

YOU DIM, K. A.; MARTIN, A.; JOSEPH, J. A. Incorporation of elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, p. 51-60, 2000.

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

APÊNDICE

TABELA 14 – CÁLCULO DO QUADRADO MÉDIO DOS FENÓLICOS TOTAIS E ANTOCIANINAS TOTAIS DOS EXTRATOS E PRODUTOS ELABORADOS

QUADRADOS MÉDIOS			
Fator de Variação	GL	Fenólicos totais	Antocianinas totais
Tratamentos	4	81948,85751**	458,20349**
Resíduos	10	116,54215	1,09807
Coeficiente de Variação (%)		3,45	8,11

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

ns não significativo ($p \geq 0,05$)

TABELA 15 – CÁLCULO DO QUADRADO MÉDIO DOS VALORES DE TEAC DOS EXTRATOS E PRODUTOS ELABORADOS

QUADRADOS MÉDIOS						
Fator de Variação	GL	Aquoso	HAF	HAQ	Geléia	Suco
Tratamentos	1	1,01332**	10,84272**	0,75658**	1,92634**	1,80813**
Resíduos	4	0,00021	0,00691	0,00915	0,00019	0,00019
Coeficiente de Variação (%)		1,41	1,75	2,05	0,60	0,52

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

ns não significativo ($p \geq 0,05$)

TABELA 16 – CÁLCULO DO QUADRADO MÉDIO DOS VALORES DE VCEAC DOS EXTRATOS E PRODUTOS ELABORADOS

QUADRADOS MÉDIOS						
Fator de Variação	GL	Aquoso	HAF	HAQ	Geléia	Suco
Tratamentos	1	4,41982**	359,82341**	6030,717**	191,37909**	541,530**
Resíduos	4	0,10125	2,84621	4,16805	0,18997	0,0083
Coeficiente de Variação (%)		1,32	1,57	1,80	0,83	0,46

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

ns não significativo ($p \geq 0,05$)

TABELA 17 – CÁLCULO DO QUADRADO MÉDIO DOS VALORES DE TEAC DAS EXTRAÇÕES DO EXTRATO AQUOSO

QUADRADOS MÉDIOS				
Fator de Variação	GL	1ª extração	2ª extração	3ª extração
Tratamentos	1	0,30100**	0,00002 ^(ns)	0,00051
Resíduos	4	0,0013	0,00001	0,0000
Coeficiente de Variação (%)		1,10	1,32	1,18

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

ns não significativo ($p \geq 0,05$)

TABELA 18– CÁLCULO DO QUADRADO MÉDIO DOS VALORES DE VCEAC DAS EXTRAÇÕES DO EXTRATO AQUOSO

Fator de Variação	GL	QUADRADOS MÉDIOS		
		1ª extração	2ª extração	3ª extração
Tratamentos	1	1185,3512**	33,95674**	4,36959**
Resíduos	4	0,08937	0,00989	0,00135
Coeficiente de Variação (%)		1,08	1,43	1,21

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

ns não significativo ($p \geq 0,05$)

TABELA 19 – CÁLCULO DO QUADRADO MÉDIO DOS VALORES DE TEAC DAS EXTRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A FRIO

Fator de Variação	GL	QUADRADOS MÉDIOS		
		1ª extração	2ª extração	3ª extração
Tratamentos	1	3,03803**	0,09290**	0,00388**
Resíduos	4	0,00286	0,00014	0,0000
Coeficiente de Variação (%)		1,33	2,05	0,84

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

ns não significativo ($p \geq 0,05$)

TABELA 20 – CÁLCULO DO QUADRADO MÉDIO DOS VALORES DE VCEAC DAS EXTRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A FRIO

Fator de Variação	GL	QUADRADOS MÉDIOS		
		1ª extração	2ª extração	3ª extração
Tratamentos	1	1025,00691**	22,27319**	12,70350**
Resíduos	4	2,31416	0,05226	0,00025
Coeficiente de Variação (%)		1,54	1,71	0,62

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

ns não significativo ($p \geq 0,05$)

TABELA 21 – CÁLCULO DO QUADRADO MÉDIO DOS VALORES DE TEAC DOS SUCOS COMERCIAIS E DE LABORATÓRIO

Fator de Variação	GL	QUADRADOS MÉDIOS			
		Suco A	Suco B	Suco C	Suco D
Tratamentos	1	37,56412**	2,80764**	11,67718**	6,47533**
Resíduos	4	0,02146	0,00030	0,00078	0,00191
Coeficiente de Variação (%)		2,53	0,52	0,99	2,002

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

ns não significativo ($p \geq 0,05$)

TABELA 22 – CÁLCULO DO QUADRADO MÉDIO DS VALORES DE VCEAC DOS SUCOS COMERCIAIS E DE LABORATÓRIO

QUADRADOS MÉDIOS					
Fator de Variação	GL	Suco A	Suco B	Suco C	Suco D
Tratamentos	1	3521,055**	3363,507**	2595,448**	1171,727**
Resíduos	4	26,3624	0,5152	1,1463	2,1034
Coeficiente de Variação (%)		2,08	0,46	0,92	1,59

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

ns não significativo ($p \geq 0,05$)

TABELA 23 – CÁLCULO DO QUADRADO MÉDIO DOS VALORES DE TEAC DOS MESES DE ARMAZENAMENTO DO SUCO ELABORADO EM LABORATÓRIO UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS

QUADRADOS MÉDIOS				
Fator de Variação	GL	6 meses	9 meses	12 meses
Tratamentos	1	4,91136**	1,95678	1,99316
Resíduos	4	0,00214	0,00110	0,00027
Coeficiente de Variação (%)		1,63	0,85	0,50

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

ns não significativo ($p \geq 0,05$)

TABELA 24 – CÁLCULO DO QUADRADO MÉDIO DOS VALORES D E VCEAC DOS MESES DE ARMAZENAMENTO DO SUCO ELABORADO NO LABORATÓRIO UTILIZANDO OS MÉTODOS DPPH E ABTS

QUADRADOS MÉDIOS				
Fator de Variação	GL	6 meses	9 meses	12 meses
Tratamentos	1	101,36329**	9038,86459**	4739,81833**
Resíduos	4	2,69989	4,42250	1,06784
Coeficiente de Variação (%)		1,30	1,14	0,67

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

ns não significativo ($p \geq 0,05$)