



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA
DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS



RAFAELA CANDIDO OLIVEIRA DA SILVA

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE-DAD PARA
DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA EM
COPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS**

DISSERTAÇÃO

Pato Branco, 2016

RAFAELA CANDIDO OLIVEIRA DA SILVA

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAREZA PARA
DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA EM
COPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de “Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos” – Área de Concentração: Química Biotecnológica.

Orientadora: Dra Tatiane L. Cadorin Oldoni.

Co-orientadora: Dra. Solange Teresinha Carpes.

Pato Branco, 2016

S586v

Silva, Rafaela Candido Oliveira da.

Validação de metodologia analítica por CLAE-DAD para determinação de compostos fenólicos e atividade biológica em coprodutos agroindustriais / Rafaela Candido Oliveira da Silva. -- 2016.

112 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiane L. Cadorin Oldoni

Coorientadora: Profa. Dra. Solange Teresinha Carpes

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Pato Branco, PR, 2016.

Bibliografia: f. 99 – 112.

1. Agroindústria – Subprodutos. 2. Fenóis. 3. Atividade antioxidante. I. Oldoni, Tatiane L. Cadorin, orient. II. Carpes, Solange Teresinha, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. IV. Título.

CDD (22. ed.) 660.281

Ficha Catalográfica elaborada por
Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco



TERMO DE APROVAÇÃO Nº 41

Título da Dissertação

**“VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE-DAD PARA
DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA EM
COPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS”**

Autora

RAFAELA CANDIDO OLIVEIRA DA SILVA

Esta dissertação foi apresentada às 13 horas e 30 minutos do dia 29 de março de 2016, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS – Linha de pesquisa em Química Biotecnológica – no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. A autora foi arguida pela Banca Examinadora abaixo assinada, a qual, após deliberação, considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni
UTFPR/PB
Presidente

Prof. Dr. Márcio Barreto Rodrigues
UTFPR/PB
Examinador

Profa. Dra. Liziara da Costa Cabrera
UFFS/Realeza
Examinadora

Visto da Coordenação

**Prof. Dra. Cristiane Regina Budziak
Parabocz**

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - PPGTP

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do PPGTP

Dedico,
À minha mãe Martinha Candido da Silva pelo apoio e dedicação incondicionais.
E ao meu esposo Jaime Fritzen, pelo apoio pessoal e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e à Nossa Senhora Aparecida pelas oportunidades que tive, pelas pessoas que colocaram em meu caminho e por me sustentarem nos momentos difíceis.

À minha mãe, por sua dedicação, apoio incondicional, orações e principalmente por acreditar em mim. Ao meu esposo Jaime por estar ao meu lado em todos os momentos, por sua compreensão e dedicação com a nossa vida.

À minha família e pessoas que amo, minha irmã Lidiane, cunhado Felipe e sobrinha Ludmila pelo incentivo. À família de meu esposo, José Francisco, Aurora, Jamil, Renatha, Abigail e Gael, pelo apoio e carinho recebido.

Especialmente, agradeço à minha orientadora Prof. Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni ou Prof. Tati, pela oportunidade, apoio e compreensão, por tornar possível a realização deste trabalho. Minha admiração por ser exemplo profissional e pessoal de dedicação, competência e ética.

À minha co-orientadora Dra. Solange Teresinha Carpes, por sua colaboração.

Aos professores participantes das bancas de defesa e qualificação Márcio Barreto Rodrigues, Liziara da Costa Cabrera e Vanderlei Aparecido Lima, por suas importantes contribuições.

À UTFPR *Câmpus* Pato Branco por seu espaço cedido e por ser responsável pela minha formação desde a graduação.

Ao PPGTP pela oportunidade e por ser responsável por minha formação.

À Fundação Araucária pelo incentivo financeiro da bolsa de pesquisa.

Ao Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental e ao Laboratório de Óleos e Gorduras do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN) da ESALQ/USP, em Piracicaba pelo espaço e equipamentos cedidos e aos seus responsáveis e colaboradores pelas orientações: Prof. Dr. Severino Matias de Alencar, Prof. Dra. Marisa A. B. Regitano d'Arce, Ivani Aparecida M. Moreno, Adna Prado Massarioli e em especial à Naiane Sangaletti Gerhard pela orientação e acolhida.

À Central de Análises e ao Laboratório de Qualidade Agroindustrial da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Câmpus* Pato Branco e a seus colaboradores, Roberta Roncatti e Diego Henrique da Silva.

Aos colegas de pesquisa e estagiários dos laboratórios: Cíntia Boeira Batista, Aline Savi, Andressa de Rossi, Natielle Azzolini, Elthon Passos, Carlise Hannel Ferreira, Thariane Bicas, Nathalie Merlin, Jeferson Magalhães e Gabriel Grott Medeiros, pela paciência, colaboração e por tornarem minha jornada mais agradável. E em especial, minha eterna gratidão à Roberta Roncatti, Matheus Calegari, Mariéli Karling e Anaclara Prasniewski por seus ensinamentos, amizade, paciência e companheirismo.

Com carinho e admiração, agradeço às minhas grandes amigas, Raquel Ludwichk, Genice Iurckevicz e Maira Casagrande pelo carinho e ajuda pessoal e profissional. E à amiga Juliana Bernardi pelos conselhos e amizade.

Aos meus colegas de mestrado: Barbara Arruda Nogueira, Leandra Schuastz Breda, Deyse Pegorini Rodrigues, Estela Bandeira, Bruno Ekawa, José Souza Júnior, Ricardo Guz, Adriana Cristina Gluitz, Bruna Gracioli, Sandra Albornoz, Gabriel Dall Orsoletta, por compartilharem dessa jornada, em especial, agradeço à Cristiane Moura, Camila Moresco, Cledes T. de Oliveira pela amizade, contribuições e conversas.

Aos Professores colaboradores do PPGTP: Henrique Emílio Zorel, Márcio Barreto Rodrigues, Patrícia Teixeira Marques, Raquel Dalla Costa da Rocha, Mário Antonio Alves da Cunha, Sirlei Dias Teixeira, Marcos Paulo Belançon, Larissa Macedo dos Santos Tonial e Vanderlei Aparecido Lima, pelos ensinamentos.

A todos esses e aos que talvez eu tivera esquecido, agradeço e compartilho com alegria essa etapa concluída e realização pessoal.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher”.

Cora Coralina

RESUMO

SILVA, Rafaela Candido Oliveira da. **Validação de Metodologia Analítica por CLAE-DAD para Determinação de Compostos Fenólicos e Atividade Biológica em Coprodutos Agroindustriais**. 2016. 112 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2016.

A região Sul do Brasil, em especial, os estados do Paraná e Santa Catarina destacam-se pelo cultivo de uvas e maçãs para consumo *in natura* e, visando agregar valor a estes produtos, processam o material para a elaboração de vinhos, sucos e geleias. Como resultado grandes quantidades de coprodutos, como cascas, sementes e bagaço, são produzidos tornando-se problemas ambientais. Estudos de reaproveitamento desses coprodutos têm despertado interesse, pois têm demonstrado um elevado potencial biológico, em virtude da presença de altos teores de compostos fenólicos, que são associados a uma menor incidência de doenças ocasionadas pelo estresse oxidativo, devido as suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antibacterianas. Atualmente, poucos estudos são apresentados sobre a composição fenólica e potencial biológico dos resíduos de uvas da variedade Bordô (*Vitis labrusca*) e maçã (*Malus domestica*) variedade Gala, cultivadas na região Sul do Brasil. Dentro deste contexto, os objetivos desse estudo foram: comparar a eficiência da extração sólido-líquido e líquido-líquido, realizar a otimização e validação de metodologia analítica por CLAE-DAD para a separação, identificação e quantificação de compostos fenólicos multiclases, avaliar a atividade antioxidante pelos métodos de sequestro dos radicais livres 2,2 difenil-1-picrilhidrazina (DPPH) e 2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolona-6-ácido sulfônico) (ABTS), método de redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} (FRAP), ORAC, CLAE-FR-ABTS *on-line*, Rancimat e determinação de compostos fenólicos totais de três coprodutos agroindustriais, bagaço e engaço de uva Bordô produzidos na região Sudoeste do Paraná e bagaço de maçã Gala oriundo do Oeste de Santa Catarina. A otimização e validação do método cromatográfico apresentaram parâmetros de qualidade satisfatórios para os compostos de interesse e a extração sólido-líquido foi o mais eficiente em extrair os fenólicos avaliados. Os três coprodutos avaliados

apresentaram teores significativos de compostos fenólicos quando analisados por CLAE, principalmente os flavonoides catequina e epicatequina, além de apresentaram significativa capacidade antioxidante. O extrato do engaço de uva apresentou a maior capacidade de sequestro dos radicais DPPH e ABTS e redução do ferro, além de elevado teor de compostos fenólicos totais. O extrato do bagaço de maçã apresentou a melhor resposta para o método Rancimat, o que indica elevado potencial em proteger o óleo da oxidação lipídica, não apresentando diferença significativa quando comparado ao antioxidante sintético TBHQ. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que os coprodutos agroindustriais analisados, são ricos em compostos fenólicos de alta capacidade antioxidante e, portanto, devem ser melhor explorados pelas indústrias de alimentos e farmacêutica.

Palavras-chave: Coprodutos agroindustriais, compostos fenólicos, atividade antioxidante, CLAE-DAD.

ABSTRACT

SILVA, Rafaela Candido Oliveira da. **Validation of Analytical Methodology HPLC-DAD for Determining Phenolic Compounds and Biological Activity in Agroindustrial by-products**. 2016. 112 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2016.

The southern region of Brazil, especially the states of Parana and Santa Catarina stand out for growing grapes and apples for fresh consumption and in order to add value to these products, process the material for the production of wine, juices and jellies . As a result large quantities of by-products, such as peels, seeds and pulp are produced becoming environmental problems. Studies reuse of these by-products have attracted interest because they have shown a high biological potential, due to the presence of high levels of phenolic compounds, which are associated with a lower incidence of disease caused by oxidative stress, due to its antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial properties. Currently, few studies are presented on the phenolic composition and biological potential of waste grape variety Bordô (*Vitis labrusca*) and apple (*Malus domestica*) Gala variety, cultivated in southern Brazil. Within this context, the objectives of this study were: compare the efficiency of solid-liquid and liquid-liquid extraction, perform the optimization and validation of analytical methodology by HPLC-DAD for the separation, identification and quantification of multiclass phenolic compounds, evaluate the activity antioxidant by sequestering methods of free radical 2,2-diphenyl-1 picrilhidrazina (DPPH) and 2,2-azino-bis (3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) solution, reduction of Fe^{3+} in Fe^{2+} method (FRAP), ORAC, RP-HPLC-ABTS online, Rancimat and determination of total phenolics three agro-industrial byproducts, pomace and stems grape Bordô produced in Paraná Southwest region and Gala apple pomace coming from the Santa Catarina West. Optimization and validation of chromatographic method showed satisfactory quality parameters for the compounds of interest and the solid-liquid extraction was more efficient in extracting phenolic evaluated. The three by-products evaluated showed significant levels of phenolic compounds when analyzed by HPLC, especially flavonoids, catechin and epicatechin besides that showed

significant antioxidant capacity. The grape stems extract had the highest sequestration capacity of DPPH and ABTS radical and reduced iron, and high content of phenolic compounds. The apple pomace extract showed the best response to the Rancimat method, which indicates a high potential to protect the oil from lipid oxidation, was no significant difference when compared to synthetic antioxidant TBHQ. The results of this study showed that the agro-industrial co-products analyzed are rich in phenolic compounds of high antioxidant capacity and therefore must be better explored by the food and pharmaceutical industries.

Keywords: Agroindustrial by-products, phenolic compounds, antioxidant activity, HPLC-DAD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos propostos para os polifenóis no sequestro de radicais livres.	29
Figura 2 – Estrutura básica de um flavonoide	31
Figura 3 – Estrutura básica dos ácidos hidroxibenzóico (A) e ácidos hidroxicinâmicos (B)	32
Figura 4 – Moléculas trans-resveratrol (A) e cis-resveratrol (B)	33
Figura 5 - Reação do ácido gálico com molibdênio VI, levando à formação de molibdênio V, detectado espectrofotometricamente a 740 nm.....	35
Figura 6 - Estrutura química do radical DPPH e reação de estabilização com um antioxidante e eppendorfs ilustrando as diferentes colorações neste ensaio.....	36
Figura 7 - Formação do radical estável com persulfato de potássio e reação com antioxidante e eppendorfs ilustrando as colorações neste ensaio.	37
Figura 8 - Redução do complexo TPTZ com Fe^{3+}	38
Figura 9 – Representação da Instrumentação para detecção CLAE-FR-ABTS/DPPH <i>on-line</i> de compostos sequestrantes de radicais.....	40
Figura 10 – Fluxograma das atividades de determinação de compostos bioativos provenientes de subprodutos agroindustriais.....	48
Figura 11 – Equipamento Rancimat 743 e amostras utilizadas (óleo de soja com extratos de BU, EU e BM).	62
Figura 12– Cromatograma obtido pelo ensaio 1: 1. ácido gálico, 2. catequina, 3. ácido vanílico, 4. ácido caféico, 5. epicatequina e ácido siríngico, 6. ácido cumárico, 7. ácido ferúlico e ácido salicílico, 8. resveratrol e rutina.....	68
Figura 13 - Cromatograma obtido pelo ensaio 2: 1. ácido gálico, 2. catequina, 3. ácido vanílico, 4. ácido caféico, 5. ácido siríngico e PI, 6. epicatequina, 7. ácido cumárico, 8. rutina, 9. ácido ferúlico, 10. resveratrol, 11. quercetina e canferol.....	69
Figura 14 - Cromatograma obtido pelo ensaio 3: 1. ácido gálico, 2. catequina, 3. ácido vanílico, 4. ácido caféico, 5. Padrão Interno (PI), 6. epicatequina, 7. ácido cumárico, 8. ácido ferúlico, 9. rutina, 10. ácido salicílico, 11. miricetina, 12. resveratrol e 13. quercetina.....	71
Figura 15 – Cromatogramas Mistura de Padrões (30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) obtidos em diferentes comprimentos de onda (280, 300, 320 e 360 nm).....	73
Figura 16 – Cromatogramas Bagaço de Uva - Extração Sólido-Líquido	84

Figura 17 - Cromatogramas Engaço de Uva - Extração Sólido-Líquido.....	85
Figura 18 - Cromatogramas Bagaço de Maçã - Extração Sólido-Líquido.....	86
Figura 19 – Cromatograma Extrato Bagaço de Uva – 280 nm e Cromatograma CLAE-FR-ABTS ^{•+} <i>on-line</i> 734 nm para Extrato Bagaço de Uva.....	93
Figura 20 - Cromatograma Extrato Engaço de Uva – 280 nm e Cromatograma CLAE-FR-ABTS ^{•+} <i>on-line</i> 734 nm para Extrato Engaço de Uva.	94
Figura 21 - Cromatograma Extrato Bagaço de Maçã – 280 nm e Cromatograma CLAE-FR-ABTS ^{•+} <i>on-line</i> 734 nm para Extrato Bagaço de Maçã.	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições para Extração dos diferentes coprodutos agroindustriais.	50
Tabela 2 - Concentração de cada composto na elaboração da curva padrão nas diferentes matrizes: BU, EU e BM.	55
Tabela 3 - Descrição das condições dos métodos testados para CLAE-DAD.	66
Tabela 4 – Parâmetros de qualidade do cromatograma calculados para o ensaio 1.	67
Tabela 5 – Condições do método cromatográfico desenvolvido após otimização. ...	72
Tabela 6 – Gradiente Fase Móvel Metodologia CLAE-DAD.	72
Tabela 7 - Coeficiente de Determinação (R^2) das curvas analíticas.	74
Tabela 8 – Limites de Detecção e Quantificação das Curvas Analíticas preparadas em solvente e na matriz.	75
Tabela 9 - %RSD para as Curvas Analíticas preparadas em solvente e na matriz. ...	77
Tabela 10 – Fator de Recuperação Curva Padrão no Solvente.	79
Tabela 11 - Fator de Recuperação Curva Padrão na Matriz.	80
Tabela 12 - Coeficiente angular das curvas analíticas preparadas em solvente e na matriz.	81
Tabela 13 – Identificação e Quantificação de Compostos Fenólicos nos extratos de coprodutos Agroindustriais.	84
Tabela 14 – Resultados dos ensaios de atividade antioxidante dos extratos de coprodutos agroindustriais.	87
Tabela 15 – Período de Indução e Fator de Proteção dos extratos de coprodutos em Óleo de soja pelo Método Rancimat.	90
Tabela 16 – Atividade antioxidante dos compostos fenólicos por CLAE- <i>on line</i>	92

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS E ACRÔNIMOS

AAPH: 2,2'-azobis (2-amidinopropano) di-hidrocloreto
ABTS•+: Radical ácido 2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOCS: *American Oil Chemists' Society*
ATCC: *American Type Culture Collection*
AUC: Área sob a curva (*Area under the curve*)
BHA: Butilhidroxianisol
BHI: *Brain heart infusion*
BHT: Butilhidroxitolueno
BM: Bagaço de Maça
BU: Bagaço de Uva
CBM: Concentração Bactericida Mínima
CIM: Concentração Inibitória Mínima
CG: Cromatografia Gasosa
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CPM: Curva Padrão da Matriz
CPS: Curva Padrão no Solvente
CV: Coeficiente de Variação
C18: Octadecil Silano
DAD: Detector de arranjo de Diodos
DPPH• Radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazina
EAG: Equivalente a ácido gálico
ELL: Extração Líquido-Líquido
ESALQ: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
ESL: Extração Sólido-Líquido
EU: Engaço de Uva
FL: Fluorescência
FR: Fase Reversa
FRAP: *Ferric Reducing Antioxidant Power*
INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia
LD: Limite de Detecção

LQ: Limite de Quantificação

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento

MS: Espectrometria de Massas (*Mass Spectrometry*)

OH: Hidroxila

OH•: Radical hidroxila

ORAC: Capacidade de absorção de radicais oxigênio (*Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay*)

PI: Padrão Interno

QuEChERS: *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*

RO•: Radicais alcóxila

ROO•: Radicais peróxila

ROOH: Hidroperóxidos

Rs: Resolução

R²: Coeficiente de Determinação

SPE: Extração em Fase Sólida (*Solid Phase Extraction*)

TBHQ: Terc-butilhidroquinona

TEAC: *Trolox equivalent antioxidant capacity*

TPTZ: Tripiridiltriazina

tr: Tempo de Retenção

Trolox: 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico

UFC: Unidade Formadora de Colônias

USP: Universidade de São Paulo

UV: Ultravioleta

wb: Largura de Base (*width base*)

%FP: Percentual de Fator de Proteção

%R: Porcentagem de Recuperação

%RSD: Desvio Padrão Relativo (*Relative standard deviation*)

α: Seletividade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 REFERENCIAL TEÓRICO	25
3.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	25
3.1.1 Resíduos Vitivinícolas: Bagaço e Engaço de Uva (<i>Vitis labrusca</i>)	25
3.1.2 Bagaço de Maçã (<i>Malus domestica</i>)	27
3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	29
3.2.1 Antioxidantes	29
3.2.2 Compostos Fenólicos	30
3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	33
3.3.1 Análise de Compostos Fenólicos Totais	34
3.3.2 Atividade Sequestrante do radical DPPH	35
3.3.3 Atividade Antioxidante pelo Método ABTS ^{•+}	36
3.3.4 Atividade Antioxidante Total pelo Método de Redução do Ferro - FRAP	37
3.3.5 Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC)	38
3.3.6 Atividade antioxidante CLAE-FR-ABTS ^{•+} <i>on-line</i>	39
3.3.7 Método RANCIMAT	40
3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA - CLAE	41
3.5 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E PREPARO DE AMOSTRA	42
3.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	44
3.6.1 Aspectos Gerais sobre Validação de Métodos	44
3.6.2 Parâmetros para Validação	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 INSTRUMENTAÇÃO	48
4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES	49
4.3 OBTENÇÃO DOS COPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS	49
4.3.1 Extração sólido-líquido	50
4.3.2 Purificação líquido-líquido adaptada	51
4.4 OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA CLAE-DAD	51

4.4.1 Ensaio 1	52
4.4.2 Ensaio 2	53
4.4.3 Ensaio 3	53
4.5 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA CLAE-DAD	54
4.5.1 Linearidade.....	54
4.5.2 Limites de Detecção e Quantificação	56
4.5.3 Precisão	56
4.5.4 Exatidão	57
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	58
4.6.1 Análise de Compostos Fenólicos Totais.....	58
4.6.2 Atividade Sequestrante do radical DPPH•.....	59
4.6.3 Atividade Antioxidante pelo Método ABTS ^{•+}	59
4.6.4 Atividade Antioxidante Total pelo Método de Redução do Ferro - FRAP	60
4.6.5 Método ORAC – <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay</i>	60
4.6.6 Atividade antioxidante CLAE-FR-ABTS ^{•+} <i>on-line</i>	61
4.6.7 Estabilidade oxidativa - método RANCIMAT	62
4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	63
4.7.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	63
4.7.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)	64
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	66
5.1 OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA CLAE-DAD.....	66
5.1.1 Ensaio 1	68
5.1.2 Ensaio 2	69
5.1.3 Ensaio 3	70
5.1.4 Condições do Método Cromatográfico – CLAE-DAD após otimização	71
5.1.5 Condições do Detector de absorção na região do Ultravioleta e Visível	73
5.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA CLAE-DAD	74
5.2.1 Linearidade.....	74
5.2.2 Limites de Detecção e Quantificação	75
5.2.3 Precisão	76
5.2.4 Exatidão	78
5.2.5 Aplicação da Metodologia CLAE-DAD após Validação	83
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	87

5.3.1 Análise de Compostos Fenólicos Totais e Atividade Antioxidante pelos métodos de sequestro dos radicais DPPH e ABTS, Redução do Ferro e (FRAP) e capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC)	87
5.3.2 Estabilidade Oxidativa – Método RANCIMAT	90
5.3.3 Atividade antioxidante CLAE-FR-ABTS ^{•+} <i>on-line</i>	91
5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	95
6 CONCLUSÕES	97
7 REFERÊNCIAS.....	99

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país com forte atividade agrícola, na região Sul, os estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, destacam-se como produtores de uva e maçã (RIBEIRO, 2007; MELLO, 2013; ALBERTI, 2014). No ano de 2015 o estado do Paraná produziu 80.000 toneladas de uva (MAPA, 2016) e em Santa Catarina a produção de maçã foi de 650.000 toneladas (POTTER, 2016).

Apenas uma pequena parte das uvas e maçãs cultivadas no sul do País é destinada ao consumo *in natura*, sendo utilizada, em sua maioria, na elaboração de vinhos, sucos e geleias. O processamento dessas frutas produz grandes quantidades de coprodutos agroindustriais, como cascas, sementes e engaço. (SOCCOL, VANDENBERGHE, 2003; MAKRIS; BOSKOU; ANDRIKOPOULOS, 2007; INFANTE et al., 2013).

Hoje, grande parte desses coprodutos é desperdiçada e não possui um destino adequado, produtores e indústrias enfrentam um problema com o descarte dessa biomassa residual que, embora seja biodegradável, necessita de um tempo mínimo para ser decomposta, constituindo-se numa fonte de poluentes ambientais e gerando custos operacionais às agroindústrias (SOCCOL, VANDENBERGHE, 2003; MAKRIS; BOSKOU; ANDRIKOPOULOS, 2007; CATANEO et al., 2008; HUBER et al., 2012(a); INFANTE et al., 2013).

Atualmente, diversos estudos têm demonstrado um elevado potencial biológico em coprodutos agroindustriais (CATANEO et al., 2008; DIN SHIRAHIGUE et al., 2010; SATO et al., 2010; SOUSA et al., 2011; SAGDIC et al., 2011; ROCKENBACH et al., 2011 (a)(b); MELO et al., 2011; INFANTE et al., 2013; BARCIA et al., 2014; BURIN et al., 2014, OLDONI et al., 2016) e a presença de diversas substâncias, como os compostos fenólicos, presentes em grandes quantidades na casca, polpa e sementes de diversos coprodutos (KARACABEY; MAZZA, 2010) vêm despertando interesse e merecem ser pesquisadas.

Os compostos fenólicos têm sido associados com o potencial bioativo de diversas matrizes devido às suas propriedades antioxidante (SOARES, 2002; SOARES et al., 2008(a); SOARES et al., 2008(b); VEDANA et al., 2008; OLDONI et al., 2011, MASSARIOLI et al., 2013, OLDONI et al., 2016), anti-inflamatória (SCOLA et al., 2011; ABE et al., 2007), anticarcinogênica (ABE et al., 2007), antifúngica

(SAGDIC et al., 2011) e antibacteriana (CABRAL et al., 2009). Estudos epidemiológicos os têm relacionado à uma menor incidência de doenças ocasionadas pelo estresse oxidativo, quando presentes em quantidades significativas na dieta, mostrando capacidade de interferir no desenvolvimento de cânceres de mama, colo e útero e contribuindo de forma significativa para os benefícios de saúde (IACOPINI et al., 2008; FONTANA; BOTTINI, 2014; BURIN et al., 2014).

Tais fatores fazem aumentar o interesse no aproveitamento de coprodutos, pois, apesar de considerados sérios problemas por seu descarte ao meio ambiente, podem servir, em muitos casos, como fontes de diversos compostos naturais de alta qualidade, permitindo assim agregar valor a este resíduo industrial. Destaca-se a aplicação desses compostos em substituição às substâncias sintéticas, principalmente na indústria de alimentos e farmacêutica. Além disso, sua utilização permite reduzir a quantidade de resíduos descartada no ambiente (RUBILAR et al., 2007; BUCIC-KOJIC et al., 2007; MELO, 2011; HUBER et al., 2012(a); INFANTE et al., 2013).

Neste sentido, devido aos benefícios relatados à saúde dos compostos fenólicos e seu impacto na qualidade dos alimentos, o desenvolvimento de metodologias analíticas para caracterização, identificação e quantificação de compostos fenólicos em amostras vegetais, como alimentos e coprodutos são temas de interesse crescente (FONTANA; BOTTINI, 2014).

Diferentes métodos analíticos têm sido utilizados para a análise de compostos fenólicos em diferentes matrizes, no entanto, uma das técnicas mais relatadas atualmente é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, de fase reversa, acoplada a diferentes detectores, em especial, detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) (GÓMEZ-ALONSO; GARCÍA-ROMERO; HERMOSÍN-GUTIEÍRREZ, 2007; MULERO; PARDO; ZAFRILLA, 2010; ROCKENBACH et al, 2011(a)(b); SAGDIC et al., 2011; PORGALI; BÜYÜKTUNCEL, 2012; NATIVIDADE et al., 2013; BARROS et al., 2014; LIMA et al., 2014; VAN LEEUW et al., 2014; TOALDO et al., 2015).

Baseado no panorama apresentado, este trabalho tem como objetivos otimizar e validar metodologia analítica por CLAE-DAD para identificar e quantificar simultaneamente diferentes classes de compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides e estilbeno) em extratos de coprodutos agroindustriais (bagaço e engaço

de uva e bagaço de maçã) e avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana destes extratos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar e validar metodologia analítica por CLAE-DAD para separar, identificar e quantificar multiclases de compostos fenólicos, determinar a atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de coprodutos agroindustriais de engaço e bagaço de uva (*Vitis labrusca*) e bagaço de maçã (*Malus domestica Borkh*) provenientes do processamento de vinhos e sucos na região Sudoeste do estado do Paraná e Oeste de Santa Catarina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar e validar metodologia analítica por CLAE-DAD para identificar e quantificar ácidos fenólicos, flavonoides e o estilbeno trans-resveratrol nos extratos de coprodutos agroindustriais.
- Demonstrar o potencial biológico de coprodutos agroindustriais de bagaço e engaço de uva e bagaço de maçã, a fim de incentivar o seu reaproveitamento.
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais dos extratos de coprodutos agroindustriais pelo método de Folin-Ciocalteu.
- Determinar a atividade antioxidante dos extratos de coprodutos agroindustriais (bagaço de uva, engaço de uva e bagaço de maçã) pelos métodos de sequestro dos radicais livres DPPH• (2,2 difenil-1-picrilhidrazina) e ABTS•+ (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfônico), pelo

método de redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} (FRAP) e capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC) e CLAE-FR-ABTS•+ *on-line*.

- Determinar a estabilidade oxidativa dos extratos de coprodutos agroindustriais pelo método Rancimat.
- Determinar a atividade antimicrobiana dos extratos de coprodutos agroindustriais, utilizando as técnicas CIM (concentração inibitória mínima) e CBM (concentração bactericida mínima).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Devido sua grande atividade agrícola, o Brasil, é um dos países que mais produz resíduos agroindustriais e a busca por alternativas para utilização da matéria orgânica gerada vem crescendo dentro de vários centros de pesquisa (CATANEO et al., 2008). A gestão agroindustrial preconiza uma tecnologia limpa com o gerenciamento adequado dos resíduos produzidos em meio agrícola e nas indústrias derivadas (COELHO; WOSIACKI, 2010).

A produção sustentável de alimentos e a valorização de resíduos tornaram-se questões importantes na vida moderna e estão se tornando importantes problemas para as indústrias (WIJNGAARD; BRUNTON, 2010). Sendo assim, a identificação de substâncias, responsáveis pela atividade antioxidante, presentes no bagaço e engaço da uva e no bagaço da maçã, permitiria agregar valor a estes coprodutos industriais, que são comumente descartados no meio ambiente (BUCIC-KOJIC et al, 2007).

3.1.1 Resíduos Vitivinícolas: Bagaço e Engaço de Uva (*Vitis labrusca*)

A produção de uvas no Brasil teve início no século XVI e atualmente está concentrada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste, sendo uma atividade consolidada e com significativa importância socioeconômica (GUERRERO et al, 2008; ROCKENBACH, 2008). Apenas uma pequena parte das uvas cultivadas no sul do País é destinada ao consumo *in natura*, sendo utilizada, em sua maioria, na elaboração de vinhos, produção que representa mais de 90% da produção nacional de vinhos (MAPA, 2015).

No estado do Paraná, a vitivinicultura também teve início com a colonização e se desenvolveu no século XVI, porém a fixação da cultura de videiras ocorreu apenas em meados do século XIX com a chegada de descendentes de italianos

vindos do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (ZARTH et al, 2007). Segundo dados da Embrapa de 2012, o Paraná é um dos estados com maior produção de uva, sendo inferior somente aos estados do Rio Grande do Sul, Pernambuco e de São Paulo, com uma área plantada de 6.202 hectares e uma produção de aproximadamente 70.500 toneladas no ano de 2012 (MELLO, 2013).

As uvas são consideradas uma das maiores fontes de compostos fenólicos quando comparadas a outras frutas e vegetais. Os principais fenólicos presentes na uva são os flavonoides (antocianinas, flavanóis e flavonóis), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos) e uma larga variedade de taninos (ROCKENBACH, 2008; ABE et al., 2007).

A maioria dos dados disponíveis na literatura sobre a composição fenólica de uvas e vinhos diz respeito à produção de vinho em países tradicionais, como os da Europa, e as uvas investigadas são predominantemente uvas para produção de vinhos finos (*Vitis vinifera* L.). No entanto, há poucas informações relatadas na literatura sobre os compostos fenólicos individuais de variedades de uvas americanas (*Vitis labrusca* L.) e a sua atividade antioxidante (BURIN et al., 2014).

Variedades americanas e híbridas, como Isabel, Concord, Bordô e Niágara, são amplamente cultivadas no Brasil. Sendo que estas variedades apresentam uma melhor adaptação nas mais diversas condições de clima brasileiro, e são processadas para a produção de suco, vinhos de mesa, doces e geleias (BURIN et al., 2014).

Os compostos fenólicos, presentes na uva, passam parcialmente para o vinho, mas, considerando que a maior parte destes compostos é encontrada nas partes sólidas da uva (pele, polpa e sementes), uma grande proporção permanece nos resíduos da vinificação, podendo ser recuperados posteriormente por extração (ROCKENBACH, 2008; GUERRERO et al, 2008).

Durante a produção de vinho ou suco de uva são geradas altas quantidades de resíduos que são identificados como sendo o bagaço (que representa 12 a 15% em peso da matéria-prima inicial), as sementes, o folhelho, o engaço, as borras e o sarro (BUCIC-KOJIC et al., 2007; ROCKENBACH, 2008).

Hoje, grande parte do bagaço produzido pelas vinícolas é desperdiçado, produtores e indústrias vinícolas enfrentam um problema com o descarte dessa biomassa residual que embora seja biodegradável, necessita de um tempo mínimo

para ser decomposta, constituindo-se numa fonte de poluentes ambientais. Dados da indústria mostram que na produção de 100 litros de vinho branco obtêm-se 31,7 kg de resíduos, dos quais mais de 20 kg são de bagaço e na produção de 100 litros de vinho tinto obtêm-se 25 kg de resíduos, em que aproximadamente 17 kg são de bagaço (CATANEO et al., 2008; HUBER et al., 2012(a)).

Deste modo, é importante explorar esses resíduos vinícolas, como o bagaço e o engaço de uva, que apresentam propriedades fitoterápicas de importância para as indústrias farmacêuticas, químicas e de alimentos, podendo ser uma boa e barata fonte de compostos naturais de alta qualidade, permitindo assim agregar valor a este resíduo industrial, que atualmente é descartado (BUCIC-KOJIC et al., 2007; HUBER et al., 2012(a)).

3.1.2 Bagaço de Maçã (*Malus domestica*)

A maçã é uma das frutas mais cultivadas do mundo. No Brasil, a cultura de maçã foi instalada na década de 70, quando a produção não alcançava 15 toneladas por ano, entretanto atualmente chega a aproximadamente 1.400.000 toneladas (ALBERTI, 2014; RIBEIRO, 2007). O Brasil produziu, em 2011, dado consolidado pelo IBGE, 1,3 milhão de toneladas de maçãs, o que o classifica como 9º maior produtor mundial (MAPA, 2013).

No Brasil, a produção de maçãs se concentra em duas cultivares, a Gala e a Fuji sendo que a cultivar Gala é a mais plantada no Brasil e apresenta propriedades sensoriais, devido à sua suculência, ao sabor doce e média acidez. Os plantios da macieira concentram-se principalmente na região Sul, nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Segundo informações da Associação Brasileira de Produtores de Maçã (ABPM), a produção de maçãs no Brasil é crescente (RIBEIRO, 2007; ALBERTI, 2014). Conforme dados da Associação dos Produtores de Maçã e Pêra de Santa Catarina (AMAP), em Santa Catarina, atinge um total de 2.497 pomicultores, e no estado do Paraná, a pomicultura ocupa uma área de 1.800 ha, com uma safra de aproximadamente 47,8 mil toneladas em 2013 (MAPA, 2013).

Tradicionalmente consumida *in natura*, a maçã é considerada uma excelente fruta de mesa, mas pode ser encontrada também na forma de produtos derivados,

como suco, sidra, vinagre, doces e geleias (RIBEIRO, 2007). Apresentando elevados teores de fitonutrientes, tais como flavonoides, polifenóis e ácidos fenólicos (derivados do ácido hidroxicinâmico), encontrados principalmente na casca, (ALBERTI et al., 2014; SOARES et al., 2008(a); (c)).

O teor de compostos fenólicos no epicarpo, mesocarpo, endocarpo e semente em muitas cultivares de maçãs está entre 1.000 e 6.000 mg/kg de peso fresco, mas em algumas cultivares pode chegar a 10.000 mg/kg de peso fresco (ALBERTI et al., 2014).

Durante o processamento das maçãs, o resíduo de extração é o bagaço, que é constituído por uma mistura heterogênea de casca, semente, cálice, haste e polpa, sendo o principal coproduto da agroindústria da maçã resultante do processo de prensagem. O resultado dessa extração compreende as cascas e polpa (94,5%), as sementes (4,4%) e os centros (1,1%). O conteúdo de açúcares totais é elevado, cerca de 40% em base seca, mas pode apresentar menores teores com alterações no processamento de extração de suco (COELHO; WOSIACKI, 2010).

A produção de bagaço de maçãs no Brasil foi estimada em 50.000 toneladas de bagaço fresco, em 2007, a partir dos dados de produção e industrialização (COELHO; WOSIACKI, 2010). No Brasil, o bagaço é utilizado como alimento animal (sem tratamento algum), que muitas vezes, em virtude de resíduos de açúcares associado às altas temperaturas de verão e exposição ao meio ambiente, fermenta e causa alterações sensoriais no leite, além de sintomas de diarreia no animal (ALBERTI, 2014).

Os compostos bioativos da fruta *in natura* permanecem na biomassa fresca, mesmo após o processo de produção do suco. Portanto, são relevantes os estudos que avaliem estes coprodutos, tendo em vista que possivelmente contenham além de outros constituintes, compostos com propriedades antioxidantes (SOARES et al., 2008(a); SOARES et al., 2008(c)). Partindo de uma matéria-prima de qualidade e sendo adequadamente desidratados, podem ser armazenados e servir como matéria-prima para a obtenção de componentes de alto valor agregado. Outra aplicação importante é a recuperação dos recursos naturais antioxidantes, sob a forma de polifenóis (ALBERTI, 2014; COELHO; WOSIACKI, 2010; WIJNGAARD; BRUNTON, 2010).

3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.2.1 Antioxidantes

Os antioxidantes podem ser descritos como: “qualquer substância que diminui ou previne significativamente a oxidação de outra substância, sempre que presente em menor concentração quando comparada a substância oxidável de interesse” (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

As substâncias antioxidantes podem apresentar diferentes propriedades protetoras e agir em diversas etapas do processo oxidativo, atuando por diferentes mecanismos (SILVA et al., 2010). Os mecanismos que têm sido propostos para a ação antioxidante são: (a) transferência de átomos de hidrogênio; (b) perda de prótons (H^+) seguida da transferência de elétrons; (c) transferência de elétrons acoplada a de prótons (Figura 1) (INFANTE, 2013).

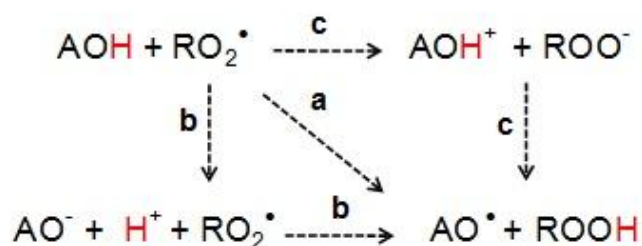


Figura 1 - Mecanismos propostos para os polifenóis no sequestro de radicais livres.

Fonte: adaptado de WRIGHT et al., 2001; STEPANIĆ et al., 2013; INFANTE, 2013.

Os principais antioxidantes nos vegetais são as vitaminas C e E, os carotenoides e os compostos fenólicos, especialmente os flavonoides (SILVA et al., 2010). Os antioxidantes nos processos oxidativos, são capazes de prevenir o desenvolvimento da reação em cadeia decompondo os produtos primários da oxidação a compostos não reativos e, em alguns casos, agindo como quelantes de íons metálicos (Cu^{2+} e Fe^{2+}) que atuam como catalisadores da oxidação (BIANCHI; ANTUNES, 1999; RAMALHO; JORGE, 2006).

O butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ), eritorbato de sódio e propil galato, são compostos antioxidantes presentes no grupo dos polifenóis e são os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos. Apesar de atuarem como antioxidantes, estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade de estes antioxidantes sintéticos apresentarem efeito carcinogênico em experimentos com animais. A redução do nível de hemoglobina e a hiperplasia de células basais foram atribuídas ao uso de TBHQ (RAMALHO; JORGE, 2006; SOUSA et al., 2007).

Pelos motivos apresentados anteriormente, o uso destes antioxidantes em alimentos é limitado, sendo proibido seu uso em diversos países, TBHQ não é permitido no Canadá e na Comunidade Econômica Européia. No Brasil, o uso destes antioxidantes é controlado pelo Ministério da Saúde que limita 200 mg kg^{-1} para BHA e TBHQ e 100 mg/g para BHT como concentrações máximas permitidas. Por isso, o interesse em encontrar antioxidantes a partir de fontes naturais, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles, para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico, tem aumentado consideravelmente (DEGÁSPARI E WASZCZYNSKYJ, 2004; RAMALHO; JORGE, 2006; SOUSA et al., 2007).

3.2.2 Compostos Fenólicos

Uma importante característica das plantas é sua capacidade de sintetizar uma grande variedade de compostos com baixo peso molecular, conhecidos como metabólitos secundários. Esses metabólitos são substâncias que geralmente não fazem parte do metabolismo básico da planta e possuem características químicas muito variadas (ROCKENBACH, 2008).

Uma das principais classes produzidas pelo metabolismo secundário das plantas são os compostos fenólicos, que são substâncias amplamente distribuídas na natureza, sendo que já foram detectados pelo menos 8000 destes compostos em plantas (SILVA et al., 2010; ANGELO; JORGE, 2007). Esta classe de compostos apresenta uma grande diversidade e divide-se em flavonoides (polifenóis) e não flavonoides (ácidos fenólicos e estilbenos). Os ácidos fenólicos podem ser divididos

em derivados dos ácidos hidroxibenzóicos e dos ácidos hidroxicinâmicos. Já os flavonoides possuem como principais subclasses flavonóis, flavanóis, flavonas, flavanonas e isoflavonas (SILVA et al., 2010; SOARES, 2002).

A presença de compostos fenólicos em plantas tem sido amplamente estudada, devido a sua importância, estando diretamente relacionados com a cor, adstringência e aroma em vários alimentos. Além disso, estes compostos se formam em condições de estresse, como infecções, fermentos, radiações UV, dentre outras, atuando na defesa contra organismos patogênicos. Atuam também inibindo a oxidação lipídica e a proliferação de fungos e bactérias (SOARES et al., 2008(c); SOARES, 2002).

3.2.2.1 Flavonoides

Os flavonoides compreendem um grupo de compostos fenólicos amplamente distribuídos nas frutas e nos vegetais, apresentando-se sob muitas variações como flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas e isoflavonas. Suas principais fontes são: café, cebola, maçã, uva, cerveja e vinho tinto (SILVA et al., 2010). São compostos de baixo peso molecular que apresentam como estrutura básica o núcleo flavânico, consistido em 15 átomos de carbono arranjados em uma configuração $C_6-C_3-C_6$. Sua estrutura é constituída basicamente por dois anéis aromáticos (A e B) ligados por uma ponte de três carbonos, usualmente na forma de anel heterocíclico (Figura 2) (SOARES, 2002; MAMEDE; PASTORE, 2004).

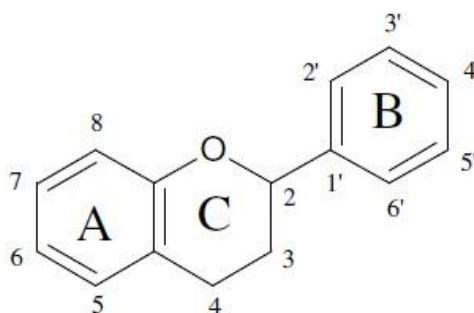


Figura 2 – Estrutura básica de um flavonoide

Fonte: BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006.

3.2.2.2 Não flavonoides

Na classe dos não flavonoides estão os derivados dos ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos (Figura 3). Sua atividade antioxidante está relacionada com a posição dos grupos hidroxilas e também com a proximidade do grupo $-\text{CO}_2\text{H}$ em relação ao grupo fenil. Quanto mais próximo esse grupo estiver do grupo fenil, maior será a capacidade antioxidante do grupo hidroxila na posição meta (SILVA et al., 2010; MAMEDE; PASTORE, 2004; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Os fenóis ácidos encontram-se em diversas frutas, especialmente nas uvas, onde se encontram em maior quantidade nas sementes e no engaço da uva (MAMEDE; PASTORE, 2004).

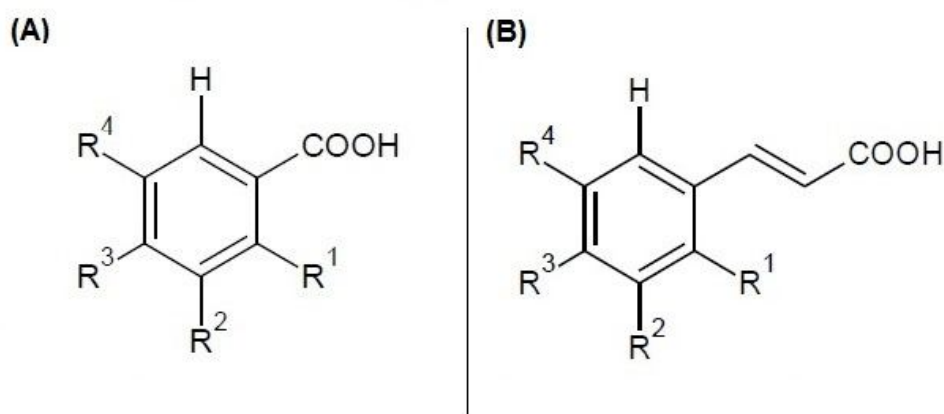


Figura 3 – Estrutura básica dos ácidos hidroxibenzóico (A) e ácidos hidroxicinâmicos (B)

Fonte: adaptado de MAMEDE; PASTORE, 2004.

No grupo dos ácidos hidroxibenzóicos destacam-se os ácidos protocatecuíco, vanílico, siríngico, gentísico, salicílico, elágico e gálico. Compostos que possuem o grupo carboxílico ligado ao anel aromático (C_6-C_1) e sofrem substituições nas posições meta e para (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; MAMEDE; PASTORE, 2004).

Enquanto os ácidos hidroxicinâmicos, são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral, ligada ao anel aromático (C_6-C_3), sendo os mais comuns na natureza os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sináptico (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; ANGELO; JORGE, 2007).

Outra importante classe dos compostos fenólicos não flavonoides presente em alimentos é a classe dos estilbenos. Sendo o resveratrol seu composto prioritário e que se apresenta em maiores concentrações no amendoim, frutas vermelhas, uvas tintas e seus derivados, como o vinho e suco (SAUTTER et al., 2005; PRESTA et al., 2009).

Na uva, o resveratrol é sintetizado principalmente na casca como resposta ao estresse causado por ataque fúngico, dano mecânico ou por irradiação de luz ultravioleta. O resveratrol ocorre naturalmente sob duas formas isômeras: *trans*-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e *cis*-resveratrol (cis-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) (Figura 4). O isômero *trans*-resveratrol é a forma mais abundante e geralmente é convertido para *cis*-resveratrol em presença da luz visível, pois esta forma é mais estável (SAUTTER et al., 2005).

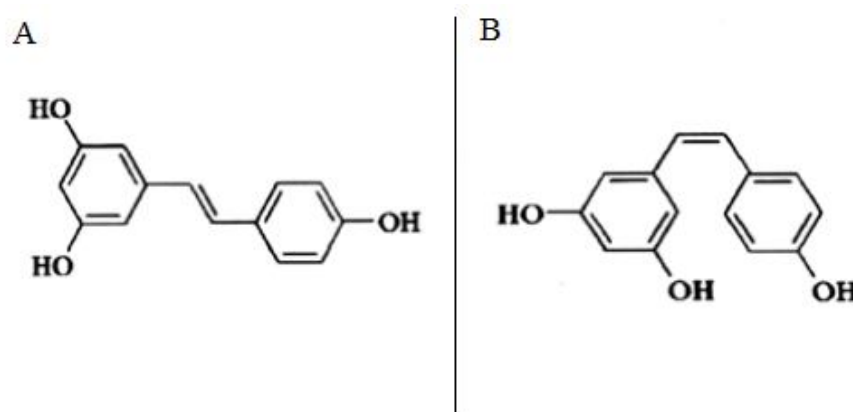


Figura 4 – Moléculas *trans*-resveratrol (A) e *cis*-resveratrol (B)

Fonte: SAUTTER et al., 2005.

Compostos flavonoides e não flavonoides, como os ácidos fenólicos e estilbenos têm sido amplamente estudados em resíduos agroindustriais, de diversas frutas, em especial uva e maçã (GÓMEZ-ALONSO; GARCÍA-ROMERO; HERMOSÍN-GUTIEÍRREZ, 2007; MULERO; PARDO; ZAFRILLA, 2010; ROCKENBACH et al, 2011(a)(b); SAGDIC et al., 2011; PORGALI; BÜYÜKTUNCEL, 2012; NATIVIDADE et al., 2013; BARROS et al., 2014; LIMA et al., 2014; VAN LEEUW et al., 2014; TOALDO et al., 2015).

3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Atualmente existe uma série de métodos *in vitro* para avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais, tendo em vista a grande variedade de compostos com propriedades antioxidantes, além da complexidade quanto ao seu modo de combater os distintos radicais livres em sistemas biológicos (SOARES et al, 2008(a)).

A maioria dos métodos de determinação da atividade antioxidante *in vitro*, aplicados atualmente tem como base a formação de radicais livres, os quais podem ser capturados pelo composto antioxidante.

Sabendo-se que distintos são os mecanismos de ação dos compostos, a reatividade das moléculas e a influência da composição do meio, a avaliação antioxidante sob diferentes abordagens é altamente recomendável. Sendo assim, vários métodos têm sido desenvolvidos no intuito de identificar extratos ou substâncias naturais potencialmente antioxidantes e benéficas à saúde. Nos quais nítidos são os esforços para tornar as condições dos testes *in vitro* cada vez mais próximas às observadas em organismos e produtos alimentícios, principalmente no que se refere às espécies reativas, ao pH e temperatura (INFANTE, 2013).

Contudo, ainda não se tem disponível uma metodologia conveniente para uma rápida quantificação antioxidante reunindo todas as formas pelas quais um composto pode exercer a sua atividade. O que significa dizer que a aplicação de um único método dificilmente irá traduzir de modo satisfatório o comportamento de uma amostra (INFANTE, 2013).

3.3.1 Análise de Compostos Fenólicos Totais

O método Folin-Ciocalteu, desenvolvido em 1927, tem sido extensivamente utilizado para medir o conteúdo total de fenóis em produtos naturais, os quais contêm compostos fenólicos (SOUSA et al., 2007; OLIVEIRA, 2011), e foi adotado como método oficial pela *International Organization of Vine and Wine*.

O método Folin-Ciocalteu é um método direto, sem necessidade de preparação das amostras (exceto pela diluição destas), porém este método é

afetado pela presença de proteínas, ácidos nucleicos e aminoácidos que devem ser considerados na otimização do método (ANGELO; JORGE, 2007).

O reagente Folin-Ciocalteu consiste de mistura dos ácidos molibdênio e tungstênio, no qual o molibdênio encontra-se no estado de oxidação (VI) (cor amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^4]$, (Figura 5), cuja coloração permite a determinação, por espectrofotometria visível a 740 nm, da concentração das substâncias redutoras (SOUSA et al., 2007; OLIVEIRA, 2011).

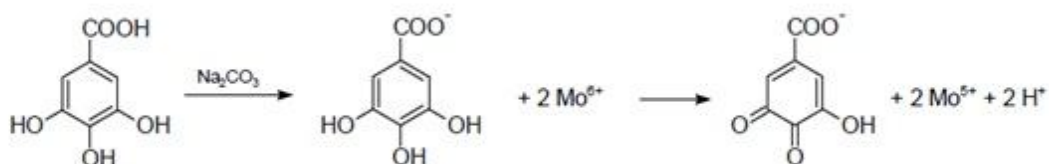


Figura 5 - Reação do ácido gálico com molibdênio VI, levando à formação de molibdênio V, detectado espectrofotometricamente a 740 nm.

Fonte: OLIVEIRA, 2011.

3.3.2 Atividade Sequestrante do radical DPPH

O método de sequestro de radicais livres desenvolvido por BRAND-WILLIAMS et al. (1995) e RUFINO et al. (2007a), baseia-se na descoloração de uma solução composta de radicais estáveis DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) de cor violeta quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio. O método consiste em inibir os radicais DPPH, através da transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (SOUSA et al., 2007; ROCKENBACH, 2008).

Verifica-se através da estrutura do DPPH (Figura 6) que o composto pode aceitar um elétron ou radical hidrogênio para então se transformar em uma molécula estável. O DPPH apresenta uma absorção característica no comprimento de onda de 517 nm, e em solução orgânica possui uma coloração violeta intensa. A partir da redução do radical DPPH por um antioxidante, seu elétron se torna emparelhado,

diminuindo assim sua absorvidade, transformando-se de uma coloração violeta para amarela.

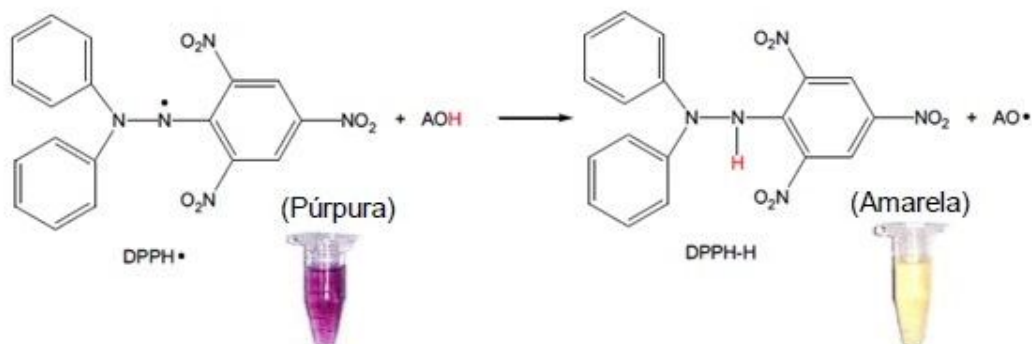


Figura 6 - Estrutura química do radical DPPH e reação de estabilização com um antioxidante e eppendorfs ilustrando as diferentes colorações neste ensaio.

Fonte: INFANTE, 2013.

O DPPH radical não reage com flavonoides que não apresentam grupos hidroxilas (–OH) no anel B, bem como, com ácidos aromáticos contendo apenas um grupo –OH (ROCKENBACH, 2008).

3.3.3 Atividade Antioxidante pelo Método ABTS^{•+}

Segundo metodologia desenvolvida por Re et al. (1999) e RUFINO et al. (2007b) o radical ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfônico) pode ser formado a partir de uma reação química, com a redução do ABTS pelo persulfato de potássio (ROCKENBACH, 2008; TREMOCOLDI, 2015).

O radical ABTS^{•+} apresenta uma cor esverdeada e pode chegar a formar mais de 60 % de radicais livres depois de 16 horas de incubação. Ao reagir com os antioxidantes presentes na amostra, o radical vai descolorindo e esse decaimento de coloração é medido pela absorvância a 734 nm (Figura 7) (ROCKENBACH, 2008).

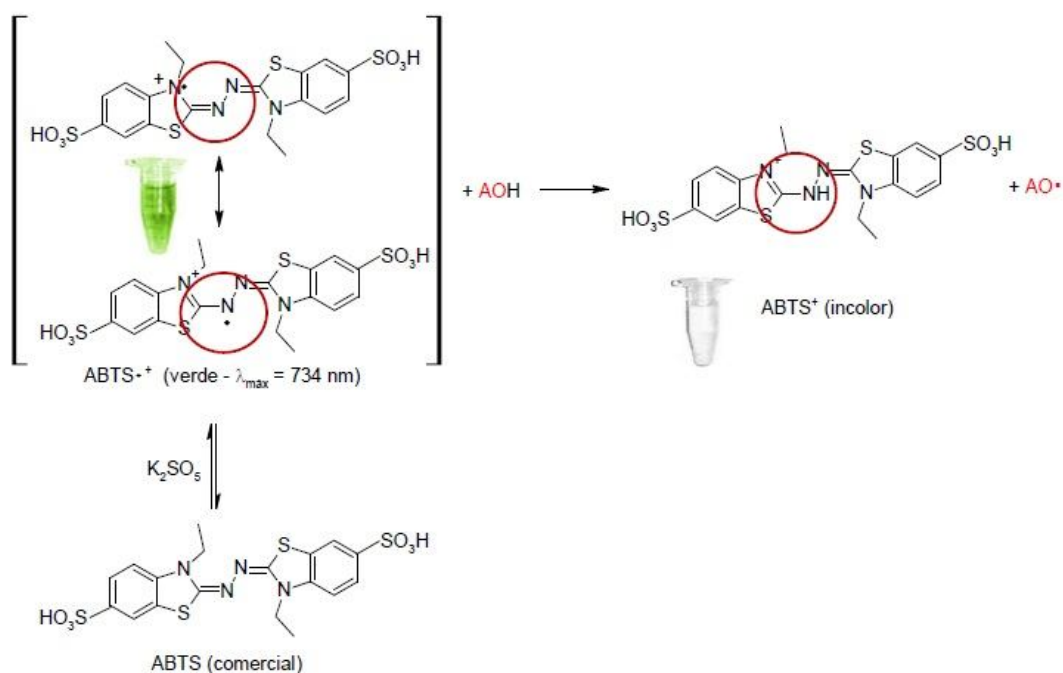


Figura 7 - Formação do radical estável com persulfato de potássio e reação com antioxidante e ependorf's ilustrando as colorações neste ensaio.

Fonte: OLIVEIRA, 2011.

Os resultados obtidos das análises antioxidantes são equiparados ao Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico 97%), antioxidante sintético, hidrossolúvel e similar à vitamina E, e são expressos em TEAC (quantidades equivalentes a Trolox) (ROCKENBACH, 2008).

3.3.4 Atividade Antioxidante Total pelo Método de Redução do Ferro - FRAP

Para realização do método de atividade antioxidante FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) utilizou-se a metodologia descrita por KUKIC et al. (2008), com algumas modificações e RUFINO et al. (2006).

O método FRAP não é baseado na capacidade de captura de radicais livres, mas sim na habilidade de redução do complexo ferritripiridiltriazina (Fe^{3+}) na presença de 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ), em meio ácido, a ferroso tripiridiltriazina (Fe^{2+}), de intensa cor azul, pelos agentes antioxidantes presentes (Figura 8) causando um aumento na absorbância a 595 nm (ROCKENBACH, 2008).

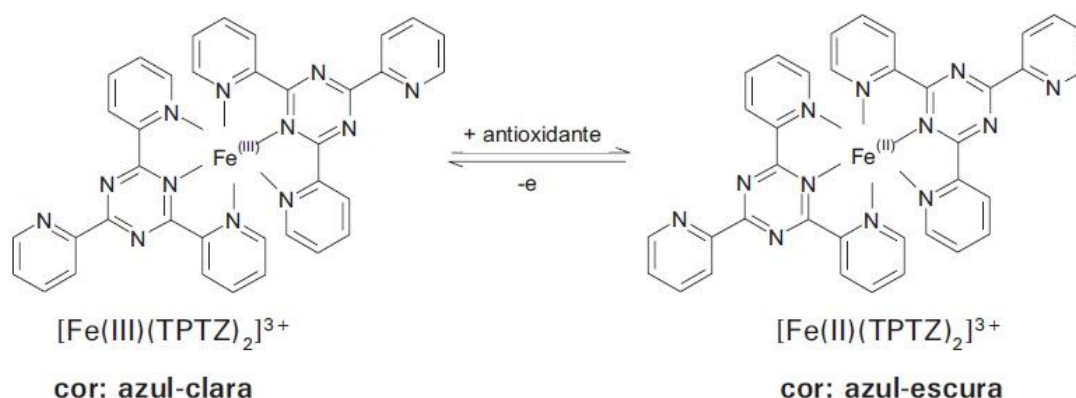


Figura 8 - Redução do complexo TPTZ com Fe³⁺

Fonte: RUFINO et al., 2006.

A absorvância final é interpolada em uma curva padrão de Trolox, e os resultados são expressos como TEAC. O fator limitante deste método é que nem todos os antioxidantes presentes em uma matriz complexa reduzem o ferro, assim como nem todo redutor do Fe³⁺ a Fe²⁺ é antioxidante. Porém, este método é muito utilizado em conjunto com outros ensaios para análises de plantas e alimentos (ROCKENBACH, 2008).

3.3.5 Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC)

O método da capacidade de absorção de radicais oxigênio – ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay*) avalia a atividade antioxidante por meio da inibição da oxidação, induzida pelo radical peróxido, por transferência de átomos de hidrogênio. Atualmente, tem sido considerado um dos métodos mais relevantes aos sistemas biológicos, pois é capaz de medir a capacidade de uma amostra em inibir reações de oxidação induzidas por uma espécie reativa de oxigênio, o radical peróxido, que é o mais comum dos radicais encontradas no corpo humano (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; KARACABEY; MAZZA, 2010).

Na realização do método ORAC, o radical peroxil, gerado pela reação do AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropano) di-hidrocloreto) com oxigênio atmosférico, reage com o indicador fluorescente (fluoresceína), cuja intensidade do sinal emitido diminui à medida que sua estrutura é atacada por esses radicais, formando um

produto não fluorescente, que pode ser medido por espectrofluorometria (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; KARACABEY; MAZZA, 2010). Os resultados são expressos em unidade de ORAC ou equivalentes de Trolox (TEAC), que corresponde à quantidade de trolox em μmol que tem a mesma atividade antioxidante para o radical peroxila em 1L de plasma (INFANTE, 2013).

A análise da atividade antioxidante pelo sequestro do radical $\text{ABTS}^{*\cdot}$ por CLAE-FR- $\text{ABTS}^{*\cdot}$ *on-line* foi realizada utilizando Cromatógrafo a Líquido SHIMADZU e fase estacionária de fase reversa MICROSORB-MV 100 C18, no LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E ANÁLISE INSTRUMENTAL – ESALQ/USP, em Piracicaba.

3.3.6 Atividade antioxidante CLAE-FR- $\text{ABTS}^{*\cdot}$ *on-line*

Recentes estudos e avanços na instrumentação permitiram o acoplamento da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção antioxidante pós-coluna. O método CLAE *on-line* para a análise de compostos que possuem capacidade de sequestro de radicais livres foi primeiramente proposto por KOLEVA; NIEDERLANDER; VAN BEEK, (2000); (2001), com parâmetros do método otimizados por diversos autores (KARAÇELIK et al., 2015).

Os compostos antioxidantes previamente separados cromatograficamente são individualmente identificados com base em sistemas de sequestro de radicais livres, os modelos mais populares utilizam uma solução de radical colorido, relativamente estável, DPPH ou $\text{ABTS}^{*\cdot}$, acrescentados por fluxo pós-coluna CLAE. Os compostos são detectados pela diminuição da absorvância em comprimentos de onda visíveis, quando o radical é convertido a sua forma reduzida (Figura 9) (KARAÇELIK et al., 2015).

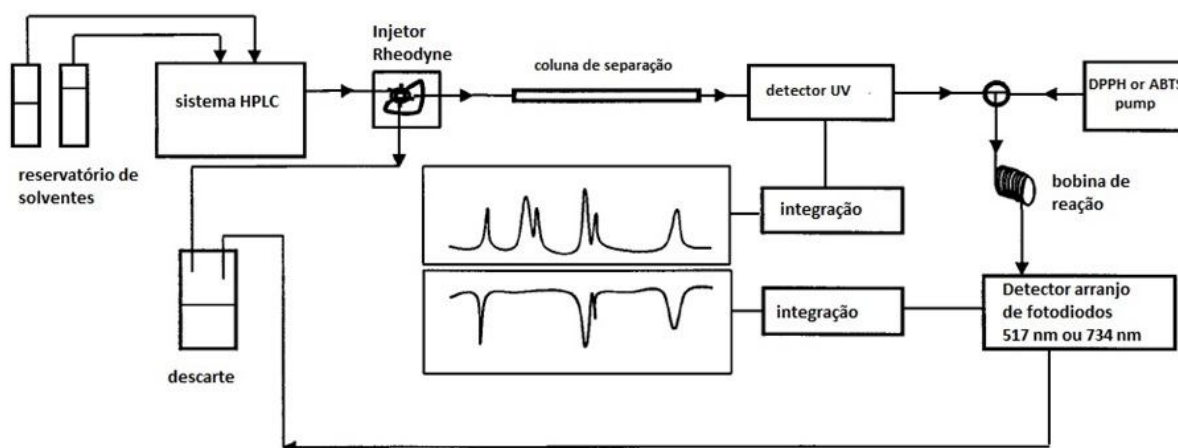


Figura 9 – Representação da Instrumentação para detecção CLAE-FR-ABTS/DPPH *on-line* de compostos sequestrantes de radicais.

FONTE: KOLEVA; NIEDERLANDER; VAN BEEK, (2000); (2001).

Estudos realizados por KARAÇELIK et al. (2015) afirmam que o método CLAE-ABTS *on-line* tem se mostrado superior em sensibilidade e seletividade ao ensaio de DPPH. Além de sua relativa simplicidade para análise de compostos antioxidante, o ensaio de ABTS apresenta menor ruído e é mais adequado para a determinação de compostos fenólicos solúveis em água. Este método tem sido aplicado para a identificação rápida de componentes antioxidantes em vários extratos de plantas, alimentos, e bebidas.

3.3.7 Método RANCIMAT

A oxidação lipídica é uma das principais causas da perda de qualidade em alimentos. Métodos rápidos têm sido empregados para avaliar a resistência de óleos e gorduras à oxidação, além de comparar a atividade antioxidante de muitos compostos bioativos em sistemas lipídicos. O método Rancimat é um método fácil e de alta reprodutibilidade e baseia-se determinação automática do tempo decorrido para se atingir a taxa máxima de oxidação de um óleo, envolvendo altas temperaturas, pois a razão da reação oxidativa é exponencialmente afetada por esse parâmetro. Esse tempo, também chamado de período de indução ou índice de estabilidade oxidativa do óleo, é determinado pelo aumento da condutividade da

água deionizada, em função dos compostos finais da oxidação do óleo nela borbulhados (FARHOOSH et al., 2008; TREMOCOLDI, 2015).

3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA - CLAE

Atualmente uma das técnicas mais utilizadas para a determinação de compostos fenólicos, é a cromatografia líquida (CL) acoplada a diferentes detectores, como Ultravioleta-Visível (UV-Vís) e arranjo de diodos (DAD) (MULERO; PARDO; ZAFRILLA, 2010; ROCKENBACH et al, 2011(a)(b); SAGDIC et al., 2011; PORGALI; BÜYÜKTUNCEL, 2012; NATIVIDADE et al., 2013; BARROS et al., 2014; LIMA et al., 2014; VAN LEEUW et al., 2014; TOALDO et al., 2015), fluorescência (FL) (GÓMEZ-ALONSO; GARCÍA-ROMERO; HERMOSÍN-GUTIEÍRREZ, 2007; NATIVIDADE et al., 2013) e espectrometria de massas (MS) (RAMIREZ-LOPEZ et al., 2014), e até utilização de técnicas associadas, como DAD-MS (PERESTRELO et al., 2012; REBELLO et al., 2013; BARROS et al., 2014; CASTRO et al., 2014) e DAD-FL (GÓMEZ-ALONSO; GARCÍA-ROMERO; HERMOSÍN-GUTIEÍRREZ, 2007; NATIVIDADE et al., 2013).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou em inglês *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), é o tipo de cromatografia líquida mais utilizada atualmente. Essa técnica se utiliza de colunas (fase estacionária), preenchidas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em uma baixa escala de tempo, com alta resolução, eficiência e sensibilidade, além de sua adequação à separação de espécies não voláteis ou termicamente frágeis e, acima de tudo, a sua ampla aplicabilidade a substâncias de grande interesse para a indústria (SILVA, 2012).

A identificação e quantificação de compostos fenólicos por CLAE-DAD garante bons resultados, uma vez que o detector DAD possui alta resolução espectral e permite checar a identidade do composto e a pureza do sinal cromatográfico. Assim, dados espectrais para cada sinal cromatográfico podem ser coletados e armazenados à medida que os compostos eluem da coluna, fornecendo

informações adicionais para confirmar a identidade do sinal (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; CALDAS et al., 2011).

A CLAE com fase reversa consiste em uma fase estacionária apolar e fase móvel polar, portanto os compostos polares são eluídos primeiro e os mais apolares eluídos posteriormente. É usualmente utilizada para a separação de misturas complexas de compostos fenólicos e outros produtos naturais em plantas. No entanto, normalmente só um grupo de compostos fenólicos ou antocianinas ou um limitado número de compostos flavonoides têm sido analisados por este tipo de cromatografia. São relatados poucos métodos adequados para triagem simultânea de flavonoides e compostos fenólicos (CHENA; ZUOA; DENG, 2001; SILVA, 2012).

3.5 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E PREPARO DE AMOSTRA

A seleção de um método para extração de compostos antioxidantes (compostos fenólicos) de uma determinada matriz, neste caso de coprodutos agroindustriais, constitui uma etapa fundamental para o sucesso do estudo. O principal objetivo da extração é proporcionar o máximo de rendimento na extração dos compostos de interesse, evitar modificações químicas desses compostos e evitar a presença de compostos com atividades prejudiciais (metais pesados, pesticidas e resíduos de solventes orgânicos), de forma que seja possível avaliar o teor dos compostos de interesse e o poder antioxidante desses extratos (SPIGNO; TRAMELLI; DE FAVERI, 2007; COELHO, 2013; OLIVEIRA, 2014).

Esse balanço só será alcançado se solventes biocompatíveis são utilizados e as condições do processo não levam a uma perda da atividade biológica dos compostos em estudo (CRESPO e BRAZINHA, 2010; OLIVEIRA, 2014). Portanto, as condições de operação desempenham um papel importante na qualidade e eficiência da extração. Parâmetros como tempo de extração, temperatura, a proporção matriz:solvente assim como o solvente escolhido, são alguns dos fatores mais determinantes a serem considerados na determinação do processo de extração. Além disso, a extração deve ser um processo exaustivo, rápido, simples e de baixo custo (SPIGNO; TRAMELLI; DE FAVERI, 2007; CRESPO e BRAZINHA, 2010; COELHO, 2013; OLIVEIRA, 2014).

Diferentes sistemas de solvente têm sido utilizados para a extração de polifenóis de matérias vegetais. A extração por solvente é uma das técnicas mais utilizadas como processo extrativo na avaliação do perfil antioxidante. Nos últimos anos, as técnicas mais utilizadas são a Extração Sólido-Líquido (ESL) e a Extração Líquido-Líquido (ELL) (CABRERA et al., 2012; COELHO, 2013; FONTANA; BOTTINI, 2014; OLIVEIRA, 2014).

A ESL e a ELL consistem na extração sucessiva de amostras sólidas e líquidas, respectivamente, com solvente orgânico empregando agitação vigorosa. Estas técnicas têm sido aplicadas para diferentes tipos de amostras, como, por exemplo, alimentos de origem vegetal ou animal (CABRERA et al., 2012).

A ESL é uma das técnicas mais utilizadas e envolve a remoção de um ou mais compostos de uma determinada matriz sólida utilizando uma matriz líquida (solvente). A maioria dessas técnicas é baseada no poder de extração de diferentes solventes utilizados e a aplicação de calor e/ou maceração (AZMIR et al., 2013; COELHO, 2013; OLIVEIRA, 2014; PERUZZO, 2014).

E a ELL, para extração de compostos fenólicos, consiste na extração sucessiva de amostras líquidas, com solvente orgânico (etanol, metanol, acetato de etila, etc) empregando agitação vigorosa, sendo o processo repetido de 2 a 3 vezes. A fase orgânica é separada em funil de separação e evaporada em evaporador rotativo. O resíduo é recuperado em solução definida pelo método (OLIVEIRA, 2014).

A eficiência da extração depende principalmente da escolha do solvente. Para isso deve-se levar em consideração a polaridade do analito, afinidade molecular entre solvente e soluto, transferência de massa, utilização de cosolvente, segurança ambiental, toxicidade para humanos e viabilidade financeira também devem ser considerados na seleção do solvente para extração de compostos bioativos (OLIVEIRA, 2014).

3.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

3.6.1 Aspectos Gerais sobre Validação de Métodos

Os métodos analíticos desenvolvidos devem originar resultados que sejam confiáveis. Para tanto, torna-se necessário avaliar o método proposto, quanto a sua exatidão e repetibilidade. Dessa forma, assim que desenvolvido um método de análise cromatográfica, é importante fazer a validação do mesmo para avaliar se fornece resultados confiáveis, de forma a poder ser aplicado rotineiramente em diferentes laboratórios. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (PRESTES et al., 2007).

3.6.2 Parâmetros para Validação

Os parâmetros para validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais ou internacionais. Infelizmente, algumas definições são diferentes entre as diversas organizações. O que se pode observar é que não há um procedimento normatizado que estabeleça como executar a validação de métodos instrumentais de separação (SILVA, 2012; RIBANI et al., 2004).

Os parâmetros analíticos devem ser baseados na intenção do uso do método e normalmente os mais encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez. Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito (RIBANI et al., 2004).

3.6.2.1 Linearidade

A linearidade de um método corresponde à capacidade em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito de interesse, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A determinação da linearidade pode ser realizada utilizando a relação matemática entre o sinal medido e a concentração do analito de interesse, geralmente obtida por uma equação de reta ($y = ax + b$), chamada de curva analítica (RIBANI et al., 2004; ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009).

Além dos coeficientes de regressão a e b , calcula-se também o coeficiente de correlação (R) ou o coeficiente de determinação (R^2), parâmetros que permitem estimar a qualidade da curva obtida. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009), pois o valor quanto mais próximo de 1,0 considera-se evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (RIBANI et al., 2004; ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009).

3.6.2.2 Limites de Detecção e de Quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004; ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009; SILVA, 2012).

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração da substância analisada que pode ser determinada utilizando um determinado procedimento experimental com um nível aceitável de precisão e exatidão (BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004; ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009; SILVA, 2012). Quando decresce o nível de concentração do LQ, a medição torna-se menos precisa. Se

houver necessidade de maior precisão, uma concentração maior deve ser registrada para o LQ (RIBANI et al., 2004).

3.6.2.3 Precisão

A precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaio independentes de uma série de medições repetidas a uma mesma amostra, a amostras semelhantes ou a uma solução padrão, em condições definidas (RIBANI et al., 2004; SILVA, 2012). É normalmente obtida usando o valor do desvio padrão relativo (RSD% *relative standard deviation*), também conhecido como coeficiente de variação (CV), e pode ser avaliada em circunstâncias específicas de medição, como a repetitividade, precisão intermediária, reprodutibilidade (RIBANI et al., 2004; DUTRA; HOFFMANN-RIBANI; RIBANI, 2010; SILVA, 2012).

A repetitividade avalia a dispersão dos resultados de medições sucessivas usando o mesmo método sob as mesmas condições de análise. A precisão intermediária é uma estimativa da precisão do método intralaboratorial, ou seja, dentro de um mesmo laboratório, utilizando as mesmas condições, mas com analistas, equipamentos e dias diferentes. Já a reprodutibilidade avalia a precisão realizada para uma mesma amostra com as mesmas condições de análise, porém em laboratórios diferentes (BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004; LEMOS; SANTOS; SANTOS, 2010; SILVA, 2012).

3.6.2.4 Exatidão

A exatidão de um método permite verificar se os resultados individuais obtidos para uma amostra apresenta concordância com um valor de referência considerado como verdadeiro. A exatidão de um método pode ser avaliada através de ensaios de recuperação e adição de padrão (RIBANI et al., 2004).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental deste trabalho foi realizado na Central de Análises da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Câmpus* Pato Branco e consistiu na realização de análises para a determinação da atividade antioxidante e antimicrobiana, utilizando métodos distintos, em três extratos de coprodutos agroindustriais coletados na região Sudoeste do Paraná (bagaço de uva - BU, engaço de uva – EU) e Oeste de Santa Catarina (bagaço de maçã - BM) e o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica por CLAE-DAD para identificação e quantificação de 12 compostos fenólicos nos três extratos.

O ensaio da atividade antioxidante pelos métodos ORAC e CLAE-FR-ABTS⁺⁺ *on-line* foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental e o ensaio de estabilidade oxidativa pelo método Rancimat, foi realizado no Laboratório de Óleos e Gorduras. Ambos Situados no Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN) da ESALQ/USP, em Piracicaba.

A sequência utilizada para realização das análises cromatográficas e as análises de caracterização química e atividade biológica dos extratos dos coprodutos agroindustriais (BU, EU e BM), estão representados no fluxograma (Figura 10).



Figura 10 – Fluxograma das atividades de determinação de compostos bioativos provenientes de subprodutos agroindustriais.

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

- Cromatógrafo a Líquido VARIAN-900 – LC0809-M015 acoplado ao detector de arranjo de fotodiodos VARIAN;
- Cromatógrafo a Líquido SHIMADZU (SCL-10Avp) acoplado aos detectores UV SPD-10AV e PD-M10Avp;
- Fase estacionária de fase reversa MICROSORB-MV 100 C18 (250 x 4,6 mm - 5 µm);
- Ultra purificador de água MILLI-Q – Milipore 40 (0,22 µm);
- Evaporador rotativo IKA – RV10C;
- Banho Maria MARCONI – MA156/A;
- Balança Analítica SARTORIUS AG GERMANY – CPA2P;
- Balança Analítica SHIMADZU – AX200;

- Agitador de Soluções (Vortex) PHOENIXLUFERCO – AP56;
- Espectrofotômetro BIOSPECTRO – SP22;
- Centrifuga HERMLE;
- Ultrassom *Ultra Sonic Clear* UNIQUE – USC2800;
- Bomba de vácuo NEW PUMP (650 mmHg);
- Equipamento Rancimat 743 - Metrohm AG, CH-9100 Herisau Switzerland;
- Liofilizador LIOTOP – L1019
- Concentrador e evaporador a vácuo Centri Vap – LAB CONCO.

4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Neste trabalho, foram utilizados padrões autênticos de compostos fenólicos (ácidos caféico, gálico, ferúlico, cumárico, salicílico e vanílico, flavonóides catequina, epicatequina, miricetina rutina, quercetina e o estilbeno *trans-resveratrol*) todos com pureza igual ou superior a 99,9%, Folin-Ciocalteu, Trolox, DPPH, ABTS e acetoneitrila e acetato de etila grau cromatográfico adquiridos pela SIGMA-ALDRICH. Álcool etílico e metílico adquiridos pela DINÂMICA e ácido acético VETEC. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura, tipo I, obtida pelo sistema Millipore.

4.3 OBTENÇÃO DOS COPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

Para a realização deste trabalho foram utilizados coprodutos agroindustriais engaço e bagaço de uva (*Vitis labrusca*) da variedade Bordô provenientes do processamento de vinhos da cidade de Mariópolis, região sudoeste do estado do Paraná. O bagaço de maçã (*Malus domestica*) da variedade Gala foi coletado em indústria produtora de suco de maçã localizada na cidade de Treze Tílias, no estado de Santa Catarina.

Após as coletas, os coprodutos foram liofilizados, triturados, homogeneizados e armazenados a uma temperatura de aproximadamente -4°C até o momento das análises.

4.3.1 Extração sólido-líquido

A condição de extração (Tabela 1) para cada coproduto foi definida em estudo anterior, desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, utilizando o planejamento fatorial. Diferentes concentrações da mistura dos solventes etanol:água, temperatura e tempo de extração foram utilizados para cada coproduto, na proporção de 2,0g de coproduto liofilizado acrescidos de 25mL da mistura de solventes, com o objetivo de obter extratos ricos em compostos fenólicos e elevada atividade antioxidante.

Tabela 1 – Condições para Extração dos diferentes coprodutos agroindustriais.

COPRODUTOS	Concentração de etanol: água (v/v)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (min.)
Bagaço de Uva (BU)	50:50	50	45
Engaço de Uva (EU)	60:40	80	45
Bagaço de Maçã (BM)	65:35	75	35

Após realização do procedimento, os extratos foram filtrados em papel filtro qualitativo com auxílio de kitassato, funil de Buchner e bomba de vácuo. Os filtrados (extratos) eram utilizados nos ensaios enquanto o material sólido era armazenado para reutilização em outras pesquisas.

Para realização da análise de determinação de atividade antioxidante pelo método ORAC os extratos foram evaporados utilizando evaporador rotativo, para eliminação do solvente orgânico e liofilizados.

Para a realização das análises antioxidantes, antimicrobianas e cromatográficas, foram utilizados os extratos hidroalcoólicos, armazenados a uma temperatura de aproximadamente -4°C , por no máximo 15 dias, até o momento das análises.

4.3.2 Purificação líquido-líquido adaptada

Devido à complexidade de matrizes de produtos naturais, como os resíduos em estudo (BU, EU e BM) e também aos baixos níveis de concentração em que os compostos fenólicos investigados podem ser encontrados nessas matrizes, o preparo de amostra se torna uma etapa fundamental para quantificação destes por CLAE-DAD.

Sendo assim, após a realização da extração dos compostos fenólicos, conforme item 4.3.1, procedeu-se a purificação por partição líquido-líquido e concentração desses extratos para posterior realização das análises cromatográficas. Testes preliminares foram realizados para determinar o melhor método de purificação, bem como as condições do processo (tipo e volume do solvente, volume do extrato e tempo de agitação) (dados não mostrados).

O procedimento foi realizado em tubo *falcon*, utilizando uma alíquota de 2,5 ml dos extratos de BU, EU e BM, extraído duas vezes com 5 mL de acetato de etila sob agitação em vórtex. As fases orgânicas foram combinadas e centrifugadas por 10 min a 3000 rpm, para garantir uma melhor separação e retirada total da fase aquosa. Após centrifugação, o solvente da fase orgânica foi evaporado em evaporador e concentrador à vácuo em temperatura ambiente. O resíduo obtido foi redissolvido em 1,2 ml de solução acetonitrila:água (40:60 v/v).

A utilização de baixos volumes do solvente acetato de etila e sua posterior recuperação por centrifugação à vácuo, proporcionam baixa geração de resíduos.

4.4 OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA CLAE-DAD

A análise cromatográfica para identificação e quantificação dos compostos fenólicos utilizou equipamento Cromatógrafo a Líquido VARIAN-900LC acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos, uma coluna de fase reversa MICROSORB-MV 100 C18 (250 x 4,6 mm x 5 µm).

Na otimização da metodologia para separação e identificação de compostos fenólicos por CLAE-DAD foram realizados diversos ensaios com injeções de 10 µL

da mistura dos padrões. As condições (composição e gradiente da fase móvel, fluxo (mL min^{-1}) e temperatura de coluna ($^{\circ}\text{C}$)) utilizadas nos principais métodos avaliados estão apresentadas, nos ensaios descritos nos itens 4.4.1 a 4.4.3.

Para garantir a eficiência na separação de todos os componentes da mistura e com a finalidade de definir o método mais indicado para identificação dos compostos fenólicos de interesse, os cromatogramas para cada método, extraídos em comprimento de onda de 280 nm, foram analisados pelos parâmetros seletividade e resolução.

A seletividade pode ser calculada através do produto entre os tempo de retenção (t_r) de dois sinais consecutivos (Equação 1). A seletividade é um parâmetro de grande importância na análise de amostras complexas. E corresponde à capacidade de um método em determinar o analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias susceptíveis de interferirem na determinação (LANÇAS, 2004).

A resolução (Equação 2), pode ser obtida pelo produto entre a diferença dos tempos de retenção (t_r) pela soma das larguras de base (w_b) de sinais cromatográficos consecutivos, e fornece uma medida quantitativa da capacidade de uma coluna em separar dois analitos. A resolução de uma coluna mostra quanto duas bandas se distanciam uma em relação à outra em comparação com as suas larguras. Uma resolução de 1,5 fornece uma separação praticamente completa, enquanto uma resolução de 0,75 não o faz (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

$$\alpha = t_{r2}/t_{r1} \quad (1)$$

$$R_s = 2(t_{r2} - t_{r1}) / (w_{b1} + w_{b2}) \quad (2)$$

4.4.1 Ensaio 1

Nos ensaios iniciais para a otimização do método foi realizada a injeção de 11 padrões dos ácidos caféico, gálico, ferúlico, cumárico, salicílico, siríngico e vanílico;

flavonoides catequina, epicatequina, rutina e o estilbeno resveratrol, em uma concentração de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$. A composição da fase móvel foi (A) $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{COOH}$ (99,9:0,1) e fase (B) CH_3OH (100%), com fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura de coluna 31°C , e gradiente iniciando com 5% de fase B, em 7 min 7% de B, 15 min 20% B, 30 min 50% B, 50 min 90% B, 55 min 90% B, 60 min 5% de B, até 65 min.

4.4.2 Ensaio 2

Para o Ensaio 2, uma mistura de 15 padrões foi utilizada (ácidos caféico, gálico, ferúlico, cumárico, salicílico, siríngico e vanílico; flavonoides canferol, catequina, epicatequina, miricetina, rutina e quercetina; o estilbeno resveratrol e o padrão interno (2,5 dihidroxibenzaldeído)), em uma concentração de $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Como alternativa, no ensaio 2 a composição da fase B foi alterada, substituindo o metanol por acetonitrila, testado um fluxo mais lento ($0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) e maior temperatura no forno da coluna (40°C). E algumas modificações no gradiente também foram testadas, sendo este teste iniciado com 0% de fase B, 7% de B em 10 min, 10% B em 20 min, 12% B em 30 min, 33% B aos 40 min, 35% B em 45 min, 100% B em 55 min até 58 min, e de 63 a 67 min com 0% de fase B. A fim de melhorar a separação e solucionar os problemas verificados na utilização do Ensaio 1.

4.4.3 Ensaio 3

Para o ensaio 3, utilizou-se também a injeção da mistura de 15 padrões (ácidos caféico, gálico, ferúlico, cumárico, salicílico, siríngico e vanílico; flavonoides canferol, catequina, epicatequina, miricetina, rutina e quercetina; o estilbeno resveratrol e o padrão interno (2,5 dihidroxibenzaldeído)), em uma concentração de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Realizou-se alterações na composição e gradiente da fase móvel, porém com as variáveis fluxo e temperatura de forno da coluna já definidos, $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e 30°C respectivamente. Para o ensaio 3 foi utilizada a composição de fase móvel (A) $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{COOH}$ (98:2) e (B) $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{COOH}:\text{CH}_3\text{CN}$ (58:2:40). E gradiente iniciando com 5% de fase B, 20% B em 2 min, em 15 min 25% B, 25 min 85% B, 30 min 85% B, 33 min 20% B, e 36 min 5% de B até 45 min.

4.5 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA CLAE-DAD

A validação do método CLAE-DAD para determinação de compostos fenólicos em extratos de bagaço e engaço de uva e bagaço de maçã foi realizada pela análise dos seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão.

Para realização das análises cromatográficas, foram preparadas soluções analíticas estoques individuais de cada composto em metanol, na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Essas soluções foram armazenadas no escuro a uma temperatura de aproximadamente -4°C . Após, foram preparadas as misturas contendo todos os compostos em diferentes concentrações, diluídas em metanol.

4.5.1 Linearidade

A linearidade da metodologia cromatográfica foi avaliada em uma faixa de concentração estabelecida para compostos fenólicos, a partir da construção de curvas analíticas, preparadas em solvente (metanol) e em cada um dos coprodutos agroindustriais (BU, EU e BM), injetadas nas condições cromatográficas estabelecidas pela otimização do método (Item 5.1.4).

Posteriormente, foram realizados os cálculos da média das áreas e o coeficiente de determinação (R^2), para cada composto analisado em todas as curvas de calibração (solvente e amostras).

4.5.1.1 Curva Padrão no Solvente (CPS)

Para construção da curva de calibração foi preparada uma mistura, em metanol com todos os compostos fenólicos (os ácidos gálico, vanílico, cafeico, ferúlico, cumárico, salicílico; os flavonoides catequina, epicatequina, miricetina, rutina e quercetina; o estilbeno resveratrol e o padrão interno (2,5 dihidroxibenzaldeído)) partindo das soluções estoques de 1000 mg L⁻¹, nas concentrações de 30; 16; 8,0; 4,0; 2,0; 1,0 e 0,5 mg L⁻¹, e injetadas em três repetições.

4.5.1.2 Curva Padrão na Matriz (CPM)

Além da curva de calibração dos padrões em solvente orgânico, foram construídas curvas analíticas para cada extrato de coproduto (BU, EU e BM), contendo todos os padrões, com cinco concentrações diferentes e injetadas em três repetições.

Inicialmente foram realizadas as extrações dos três coprodutos, conforme item 4.3.1 e em seguida fortificados com todos os padrões, partindo das soluções estoques de 1000 mg L⁻¹, acrescentadas individualmente em diferentes volumes para a obtenção de diferentes concentrações para cada composto em cada extrato (Tabela 2), pré-definidas pela realização de injeções do extrato bruto no sistema CLAE-DAD (dados não apresentados).

Tabela 2 - Concentração de cada composto na elaboração da curva padrão nas diferentes matrizes: BU, EU e BM.

Concentrações	1	2	3	4	5
BU	Catequina Epicatequina Ac. Salicílico Ac. Ferúlico		Ac. Galico Ac. Vanílico Ac. Cafeico Ac. Cumarico Rutina Miricetina	PI	Resveratrol

		Quercetina	
EU	Catequina Epicatequina Rutina Ferúlico	PI	Ac. Galico Ac. Vanílico Ac. Cafeico Ac. Cumarico Ac. Salicílico Resveratrol Miricetina Quercetina
BM	Epicatequina Rutina Ac. Salicílico Ac. Vanílico	PI	Ac. Galico Ac. Cafeico Ac. Cumarico Ac. Ferúlico Resveratrol Catequina Miricetina Quercetina

1 (80; 40; 20; 10 e 5,0 mg L⁻¹); 2 (60; 30; 15; 7,5 e 3,75 mg L⁻¹); 3 (30; 15; 7,5; 3,75 e 1,875 mg L⁻¹); 4 (20; 10; 5,0; 2,5 e 1,25 mg.L⁻¹); 5 (8,0; 4,0; 2,0; 1,0 e 0,5 mg L⁻¹).

4.5.2 Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método foram obtidos pela injeção de soluções analíticas em diferentes concentrações, preparadas através de diluições da solução da mistura dos padrões de trabalho em solvente (metanol) (CPS) e também nos extratos das matrizes BU, EU e BM (CPM). O LD e o LQ para cada composto, nas diferentes curvas de calibração foram obtidos a partir do desvio padrão do intercepto (S) (coeficiente linear) e da média da inclinação da curva de calibração (b) (coeficiente angular), conforme as Equações 3 e 4 (RIBANI et al., 2004; DUTRA; HOFFMANN-RIBANI; RIBANI, 2010).

$$LD=3*\left(\frac{S}{b}\right) \quad (3)$$

$$LQ=10*\left(\frac{S}{b}\right) \quad (4)$$

4.5.3 Precisão

Para verificar a precisão do método, valores de três repetições das soluções analíticas 30 µg mL⁻¹ (CPS) foram analisados quanto a sua precisão intermediária, ou seja em dias distintos.

A precisão intermediária foi expressa através do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV), que é calculado utilizando o desvio padrão absoluto (S) e a média aritmética das medições (X), conforme (Equação 5) (RIBANI et al., 2004; DUTRA; HOFFMANN-RIBANI; RIBANI, 2010).

$$\%RSD = (S/\bar{X}) * 100 \quad (5)$$

4.5.4 Exatidão

A avaliação da exatidão do método foi realizada a partir de ensaios de recuperação, através da fortificação dos extratos (BU, EU e BM). Sendo o número de ensaios estabelecido conforme recomendação da ANVISA, verificada para três níveis de concentração dos padrões (25, 50 e 100%) e injetados em triplicata (DUTRA; HOFFMANN-RIBANI; RIBANI, 2010).

A fortificação das amostras foi realizada pela adição de todos os padrões no solvente extrator (etanol), antes do processo de extração, partindo das soluções estoques de 1000 mg L⁻¹, que foram acrescentadas individualmente em diferentes volumes para a obtenção de diferentes concentrações para cada composto em cada extrato, e depois diluído para obtenção dos três níveis de concentração (25, 50 e 100%).

As amostras foram preparadas conforme item 4.3.1. Na sequência, parte deste extrato bruto foi diretamente injetado em sistema CLAE (Item 5.1.4) e a outra parte (2,5 mL) foi purificada utilizando a partição líquido-líquido (Item 4.3.2) previamente à injeção.

O fator de recuperação (%R) foi avaliado em todas as matrizes (BU, EU e BM) preparadas pela extração sólido-líquido (ESL) e purificação líquido-líquido (ELL). O cálculo da recuperação foi realizado subtraindo-se a concentração determinada na amostra adicionada (C₂) da concentração determinada no extrato

(não adicionado) (C_1), se houver, dividindo-se pela concentração adicionada (C_3) e multiplicando-se por 100, conforme Equação 6.

$$\%R = (C_2 - C_1 / C_3) * 100 \quad (6)$$

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.6.1 Análise de Compostos Fenólicos Totais

A análise do teor de compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por SINGLETON et al. (1999), utilizando ácido gálico como padrão.

Os extratos dos coprodutos agroindustriais BU, EU e BM foram diluídos em etanol:água 80:20 (v/v), em concentrações de 1,6; 1,6 e 8,0 mg mL⁻¹ respectivamente. O procedimento foi realizado em triplicata, transferindo-se uma alíquota de 0,5 mL das diluições para um tubo de ensaio e adicionado 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 10 g L⁻¹. A mistura permaneceu em repouso por 5 minutos, em seguida foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio 40 g L⁻¹ e os tubos deixados em repouso por 2 horas, ao abrigo da luz. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 740 nm. Uma amostra em branco foi conduzida nas mesmas condições, utilizando 0,5 mL de água.

Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG g⁻¹) foi construída uma curva de calibração com o padrão de ácido gálico, nas concentrações 5, 10, 25, 50, 75 e 100 µg mL⁻¹.

4.6.2 Atividade Sequestrante do radical DPPH•

A medida da atividade sequestrante do radical DPPH• será realizada de acordo com a metodologia descrita por BRAND-WILLIAMS et al. (1995) com algumas modificações e e RUFINO et al. (2007a). A mistura da reação foi constituída pela adição de 0,5 mL dos extratos de BU, EU e BM (diluídos em etanol:água 80:20 (v/v)) em concentrações de 400, 266,67 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente, 3,0 mL de etanol:água 80:20 (v/v) e 0,3 mL da solução do radical DPPH• 0,5 mM em etanol, após 45 minutos de reação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foi realizada leitura em espectrofotômetro a 517 nm. A quantificação foi realizada a partir de uma curva analítica utilizando trolox nas concentrações de 15, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O resultado foi expresso em capacidade antioxidante equivalente ao trolox por grama de amostra ($\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$).

4.6.3 Atividade Antioxidante pelo Método ABTS^{•+}

Para determinar a atividade antioxidante pelo ABTS, utilizou-se o método descrito por RE et al (1999) com algumas modificações e RUFINO et al. (2007b). O radical ABTS^{•+} foi formado pela reação de 5mL da solução estoque de ABTS 7mmol com 88 μL de persulfato de potássio 140 mmol L^{-1} , armazenado no escuro em temperatura ambiente durante 16 horas. Uma vez formado, o radical ABTS^{•+} foi diluído em etanol até obter-se uma medida de absorbância de 0,700 ($\pm 0,05$) em comprimento de onda de 734 nm.

Para a reação, foram adicionados 30 μL dos extratos BU, EU e BM (400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em 3 mL da solução do radical ABTS^{•+}, após 6 minutos a absorbância foi determinada em espectrofotômetro, a 734 nm. Para a construção da curva de calibração foi utilizado o antioxidante sintético trolox nas concentrações de 100, 500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O resultado foi expresso em μmol de Trolox por g de amostra ($\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$).

4.6.4 Atividade Antioxidante Total pelo Método de Redução do Ferro - FRAP

Para a determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP) utilizou-se a metodologia descrita por KUKIC et al. (2008), com algumas modificações e RUFINO et al. (2006). O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, através da mistura de 25 mL de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5 mL de solução TPTZ (10 mM TPTZ em 40 mM HCl) e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico (FeCl_3 20 mM).

Para a realização da análise uma alíquota de 90 μL dos extratos BU, EU e BM ($1,6 \text{ mg mL}^{-1}$) foram adicionados a tubos de ensaio, em seguida foram acrescentados 270 μL de água destilada e por fim, 2,7 mL do reagente FRAP adicionado. Os tubos de ensaio foram armazenados por 30 minutos. O espectrofotômetro foi zerado com a solução FRAP e as leituras foram realizadas em absorbância a 593 nm de comprimento de onda.

A curva de calibração foi realizada através da utilização de uma solução padrão de sulfato ferroso nas concentrações de 200, 500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados foram expressos em μmol de sulfato ferroso por grama de amostra ($\mu\text{mol FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$).

4.6.5 Método ORAC – *Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay*

O método ORAC foi realizado conforme a metodologia descrita por CHISTÉ et al. (2011), com algumas modificações. Para a análise foram adicionados em microplacas, na seguinte ordem: 30 μL dos extratos de BU, EU e BM diluídos em tampão fosfato de potássio 75 mM, pH 7,4 (nas concentrações 111; 100 e 136 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente), 60 μL de fluoresceína 508,25 mM e 110 μL de AAPH 76 mM.

Para a obtenção da curva padrão, o volume do extrato foi substituído por soluções de trolox nas concentrações de 12,5, 50, 100, 200 e 400 μM . O branco foi preparado somente com tampão fosfato (200 μL).

A mistura foi mantida a 37°C, para promover a termod decomposição do AAPH e, por consequência a geração de radicais peroxil, enquanto isso o sinal da

fluorescência foi monitorado a cada 1 minuto até o completo decaimento para todas as amostras (aproximadamente 2 horas). Para isso, os comprimentos de onda de excitação e de emissão utilizados foram, respectivamente, 485 nm e 528 nm.

Os resultados, expressos em $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$, foram determinados por meio da diferença dos valores entre a amostra e seu controle no que diz respeito à área sob a curva do decaimento da fluorescência (intensidade e tempo) (Equação 7), e (Equação 8).

$$AUC_{\text{AMOSTRA}} - AUC_{\text{CONTROLE}} \quad (7)$$

$$AUC_{\text{TROLOX}} - AUC_{\text{CONTROLE}} \quad (8)$$

4.6.6 Atividade antioxidante CLAE-FR-ABTS^{•+} *on-line*

A análise da atividade antioxidante pelo sequestro do radical ABTS^{•+} por CLAE-FR-ABTS^{•+} *on-line* foi realizada utilizando Cromatógrafo a Líquido SHIMADZU e fase estacionária de fase reversa MICROSORB-MV 100 C18, no LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E ANÁLISE INSTRUMENTAL – ESALQ/USP, em Piracicaba.

Para o desenvolvimento da análise foi utilizada a solução do radical ABTS^{•+} que reage com os compostos separados da amostra, pós-coluna durante 0,6 min. O fluxo do reagente do ABTS^{•+} foi de 0,8 mL min⁻¹ e a perda de cor foi detectada por meio de sinais negativos a 734 nm. O radical livre ABTS foi preparado pela mistura da solução de 7mM de ABTS (5mL) com a solução de 140mM (88mL) de persulfato de potássio. Após 16 horas, a solução de trabalho do radical ABTS foi ajustada à absorbância de 0,7± à 734nm com metanol e será utilizada no sistema de cromatografia líquida para a determinação da atividade.

A separação dos compostos da amostra foi conduzida em CLAE, de acordo com o método descrito no item 5.1.4.

Para expressar a atividade antioxidante dos compostos separados ($\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$) foi construída uma curva de trolox nas concentrações de 625, 1250, 2500, 5000 e 10000 $\mu\text{mol mL}^{-1}$.

4.6.7 Estabilidade oxidativa - método RANCIMAT

A estabilidade oxidativa foi desenvolvida de acordo com método descrito por MURCIA et al. (2001) com algumas modificações. A análise foi realizada utilizando aproximadamente 5g de óleo de soja isento de antioxidantes, obtido em indústria local, primeiramente misturado com os extratos dos coprodutos (BU, EU e BM) (Item 4.3.1) e depois com os coprodutos liofilizados e triturados, sem qualquer procedimento de extração. Os controles utilizados foram o mesmo óleo de soja sem antioxidante e sem adição de amostra (extrato ou resíduo liofilizado) (controle) e outro contendo antioxidante sintético TBHQ na proporção $100 \mu\text{g g}^{-1}$ submetidos à mesma análise, para efeitos de comparação com as amostras analisadas.

A quantidade de amostra a ser adicionada foi calculada com base nos resultados da Análise de compostos fenólicos, expressos em mg EAG g^{-1} de coproduto liofilizado e mg EAG ml^{-1} para os extratos, para uma proporção de $1000 \text{ mg EAG kg}^{-1}$ de óleo de soja. Em seguida as misturas foram submetidas a uma temperatura de $110 \pm 1^\circ\text{C}$, sob fluxo de ar seco constante a taxa de 9 L h^{-1} , conforme o método Cd 12b-92 (AOCS, 2003) em equipamento Rancimat 743 (Metrohm AG, CH-9100 Herisau Switzerland) (Figura 11), do LABORATÓRIO DE ÓLEOS E GORDURAS – ESALQ/USP, em Piracicaba.



Figura 11 – Equipamento Rancimat 743 e amostras utilizadas (óleo de soja com extratos de BU, EU e BM).

A determinação do período de indução ou índice de estabilidade oxidativa foi baseada nas leituras de condutividade crescente em função da detecção do acúmulo de compostos de oxidação. A atividade antioxidante é expressa pelo Fator de Proteção (FP) que é calculada usando o período de indução do óleo com os extratos (PI_{EXT}) e o período de indução do controle (óleo sem os extratos) (PI_{CONTR}), conforme a equação 9.

$$\%FP = \left(\frac{PI_{EXT}}{PI_{CONTR}} \right) * 100 \quad (9)$$

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.7.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada de acordo com a técnica descrita por KOO et al. (2000) e DUARTE et al. (2003), sendo utilizados tubos com tampa de rosca contendo meio de cultura líquido BHI (*Brain heart infusion*). Os microorganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella bongori* (ATCC 43975) foram inicialmente reativados a partir das culturas estoque em meio BHI líquido por aproximadamente 20 horas a 37°C e posteriormente cultivados em placas BHI ágar.

Após o crescimento bacteriano, as colônias individuais foram removidas com auxílio de uma alça de platina e suspensas em uma solução de NaCl 0,89% estéril (soro fisiológico esterilizado). Após a homogeneização, as suspensões bacterianas foram ajustadas para o valor de absorvância de aproximadamente 0,135 a 660 nm em espectrofotômetro, o que equivale a $1-2 \cdot 10^8$ UFC mL⁻¹ na escala de Mc Farland.

Um volume de 50 µL das suspensões bacterianas foram inoculados em 50 mL do meio BHI, de modo a obter uma concentração bacteriana em torno de $1-2 \cdot 10^5$ UFC mL⁻¹, sendo a mistura homogeneizada através de um agitador vórtex.

Imediatamente após a homogeneização, um volume de 190 μL do caldo inoculado e 10 μL dos extratos de BU, EU e BM (concentrações finais variando entre 72,0 mg mL^{-1} a 1,87 mg mL^{-1}), foram acrescentados em cada poço das microplacas de 96 poços, resultando em um volume final de 200 μL de solução. Para cada microplaca (micro-organismo diferente) foram feitos cinco controles: (1) meio de cultura inoculado de bactéria acrescido de 10 μL de solução de etanol:água 50:50 (v/v); (2) meio de cultura inoculado de bactéria acrescido de 10 μL de solução de etanol:água 65:45 (v/v), com o objetivo de testar a influencia do solvente presente nos extratos dos coprodutos; (3) meio de cultura inoculado de bactéria acrescido de 10 μL de solução de etanol absoluto, como controle negativo; (4) meio de cultura inoculado de bactéria acrescido de 10 μL de clorofenicol 1,2 mg mL^{-1} , como controle positivo e (5) meio de cultura inoculado de bactéria, com o objetivo de avaliar o crescimento bacteriano. Em seguida, as microplacas foram incubadas em estufa à 37°C, por 24 horas.

Após a incubação, as microplacas foram agitadas e a leitura feita através de um espectrofotômetro a 660 nm. A CIM é considerada a menor faixa de concentração do extrato em que não ocorrer crescimento bacteriano visível, ou seja, uma leitura de absorvância a 660 nm menor que 0,05.

4.7.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima, segundo a técnica descrita por KOO et al. (2000) e DUARTE et al. (2003), foram utilizadas placas de Petri contendo meio de cultura ágar BHI. Baseando-se nos resultados obtidos no teste da CIM, foram utilizados como inóculo as suspensões provenientes dos tubos que apresentaram resultado de leitura de absorvância, a 660 nm, inferior a 0,05. Uma alíquota de 50 μL das suspensões utilizadas no teste da CIM foi inoculada em placas BHI ágar esterilizado.

A CBM foi considerada a menor concentração que causa 99,9% de morte celular, ou seja, sem crescimento bacteriano visível sobre o ágar.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A separação entre as médias para os ensaios de avaliação da atividade antioxidante foi realizada utilizando o Teste de Tukey com um nível de confiança de 95% por meio do software ASSISTAT (SILVA,1996; SILVA; AZEVEDO, 2002; SILVA; AZEVEDO, 2006; SILVA; AZEVEDO, 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA CLAE-DAD

Na otimização da metodologia para a separação e identificação de compostos fenólicos por CLAE-DAD, foram realizados ensaios com injeção da mistura dos padrões, em concentração de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Dentre os métodos avaliados, três principais métodos são apresentados e discutidos. Estes métodos apresentam diferenças na composição, gradiente, fluxo da fase móvel e temperatura de forno da coluna (Tabela 3).

Tabela 3 - Descrição das condições dos métodos testados para CLAE-DAD.

Métodos	Composição FM (v/v)	Fluxo (ml.min ⁻¹)	Temp. (°C)	Gradiente Tempo (min) _ %B
1	(A) – H ₂ O:CH ₃ COOH (99,9:0,1)	1,0 ml.min ⁻¹	31°C	0 _ 5%
	(B) – CH ₃ OH (100%)			7 _ 7%
				15 _ 20%
				30 _ 50%
				50 _ 90%
				55 _ 90%
				60 _ 5%
				65 _ 5%
2	(A) – H ₂ O:CH ₃ COOH (99,9:0,1)	0,5 ml.min ⁻¹	40°C	0 _ 0%
	(B) – CH ₃ CN (100%)			10 _ 7%
				20 _ 10%
				30 _ 12%
				40 _ 33%
				45 _ 35%
				55 _ 100%
				58 _ 100%
				63 _ 0%
				67 _ 0%
3	(A) – H ₂ O:CH ₃ COOH (98:2)	1,0 ml.min ⁻¹	30°C	0 _ 5%
	(B) – H ₂ O:CH ₃ COOH:CH ₃ CN (58:2:40)			2 _ 20%
				15 _ 25%
				25 _ 85%
				30 _ 85%
				33 _ 20%
				36 _ 5%
				45 _ 5%

FM = fase móvel; CH₃OH = metanol; CH₃COOH = ácido acético; CH₃CN = acetonitrila.

Os cromatogramas apresentados foram extraídos em comprimento de onda de 280 nm e as respostas seletividade e resolução são apresentadas para cada

ensaio (Tabela 4), a fim de definir o método mais indicado para identificação dos compostos fenólicos de interesse.

Tabela 4 – Parâmetros de qualidade do cromatograma calculados para o ensaio 1.

Ensaio	Sinais	TR (min)	wb (min)	α	Rs
1	1	8,41	0,90	2,51	19,0
	2	21,13	0,40	1,11	3,61
	3	23,37	0,80	1,03	0,92
	4	24,09	0,80	1,04	1,28
	5	24,97	0,60	1,12	4,61
	6	28,01	0,70	1,04	1,47
	7	29,11	0,80	1,12	3,81
	8	32,73	1,10		
2	1	17,40	1,20	1,99	10,7
	2	34,59	2,00	1,06	1,11
	3	36,60	1,62	1,04	1,05
	4	38,23	1,48	1,03	0,62
	5	39,55	2,80	1,07	1,62
	6	42,41	0,72	1,06	3,01
	7	45,00	1,00	1,02	1,01
	8	45,99	0,96	1,02	0,55
	9	46,72	1,70	1,09	3,51
	10	50,93	0,70	1,21	7,87
	11	61,56	2,00		
3	1	5,65	0,55	2,08	11,7
	2	11,77	0,50	1,22	4,71
	3	14,36	0,60	1,06	1,44
	4	15,25	0,64	1,03	0,89
	5	15,75	0,48	1,16	4,46
	6	18,29	0,66	1,24	7,32
	7	22,61	0,52	1,08	3,64
	8	24,43	0,48	1,02	1,54
	9	25,03	0,30	1,06	4,00
	10	26,55	0,46	1,05	2,10
	11	27,77	0,70	1,03	1,25
	12	28,48	0,44	1,07	2,39
	13	30,51	1,26		

Tempo de retenção (TR), largura de base (wb), seletividade (α) e resolução (Rs).

5.1.1 Ensaio 1

Este método mostrou-se ineficiente, pois não foi capaz de separar todos os compostos de interesse, diversos compostos coeluíram (catequina e ácido siríngico, ácido ferulico e salicílico, resveratrol e rutina). Outra desvantagem foi o tempo de corrida muito extenso (65 minutos) e que conseqüentemente utiliza um grande volume de solvente, acarretando em maior quantidade de resíduos. Vale ressaltar que todos os compostos eluíram antes dos 35 minutos de corrida.

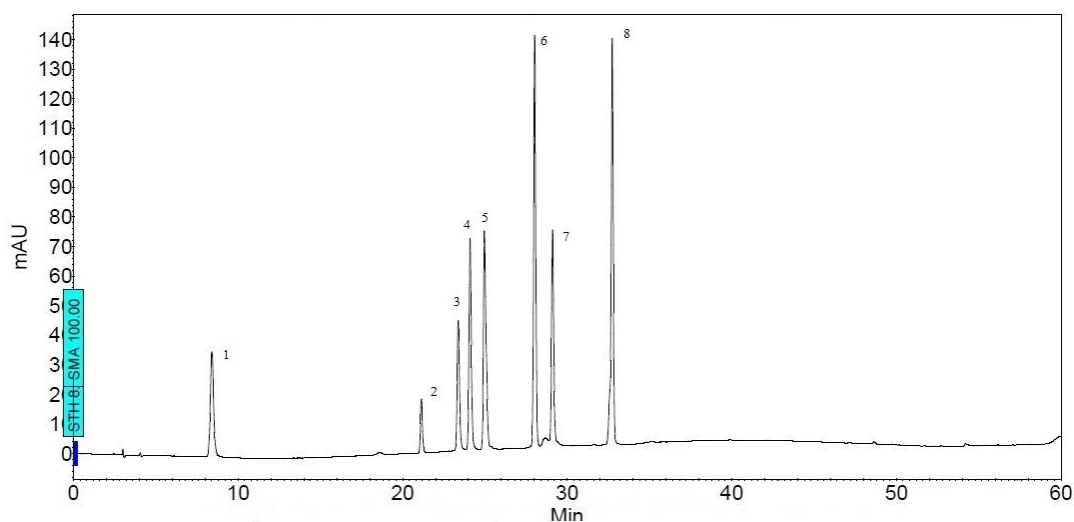


Figura 12– Cromatograma obtido pelo ensaio 1: 1. ácido gálico, 2. catequina, 3. ácido vanílico, 4. ácido caféico, 5. epicatequina e ácido siríngico, 6. ácido cumárico, 7. ácido ferúlico e ácido salicílico, 8. resveratrol e rutina.

É possível observar que dos 11 compostos presentes na mistura padrão, apenas 8 sinais foram observados (Figura 12). Os parâmetros seletividade e resolução (Tabela 4) ficaram próximos aos estabelecidos como ideal (seletividade 1,2 e resolução 1,5), no entanto, 6 compostos estão coeluído, sendo necessário melhorar a separação, o que pode ser conseguido diminuindo a força da fase móvel (FM) pela alteração da composição da fase e permitindo que os compostos tenham maior interação com a fase estacionária de baixa polaridade C18.

5.1.2 Ensaio 2

A fim de solucionar os problemas apresentados no ensaio 1, realizou-se diversos ajustes nas condições do método. Testes foram realizados alterando o gradiente da fase móvel, mas sem alterar a composição das fases, no entanto, nenhum foi eficiente o suficiente para permitir a completa separação dos compostos presentes na mistura. Como alternativa, no ensaio 2 (Figura 13) a composição da fase B foi alterada, substituindo o metanol por acetonitrila, testado um fluxo mais lento e maior temperatura no forno da coluna.

A utilização da acetonitrila, como fase móvel para separação de compostos fenólicos, vem sendo utilizada por diversos autores (FRANCISCO; RESURRECCION, 2009; WIJNGAARD; BRUNTON, 2010; NATIVIDADE et al., 2013; BURIN et al., 2014; CASTRO et al., 2014; FONTANA; BOTTINI, 2014; VAN LEEUW et al., 2014) e atualmente é o solvente orgânico mais utilizado em cromatografia líquida de alta eficiência (LANÇAS, 2009), pois apresenta vantagens como, menor viscosidade e baixa absorção na região do Ultravioleta.

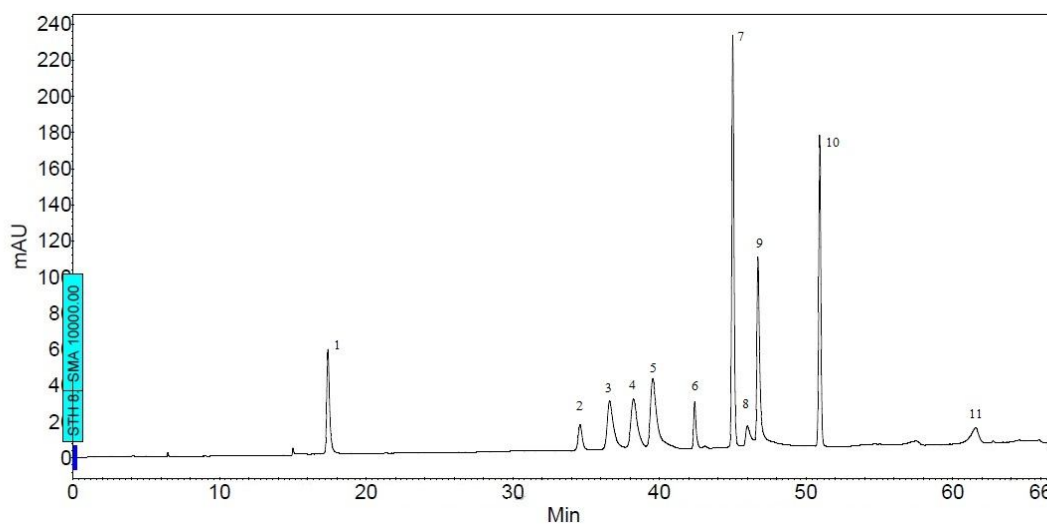


Figura 13 - Cromatograma obtido pelo ensaio 2: 1. ácido gálico, 2. catequina, 3. ácido vanílico, 4. ácido caféico, 5. ácido siríngico e PI, 6. epicatequina, 7. ácido cumárico, 8. rutina, 9. ácido ferúlico, 10. resveratrol, 11. quercetina e canferol.

Comparando-se os resultados dos ensaios 1 e 2 foi possível observar que o solvente acetonitrila foi mais eficiente na separação dos compostos. Observa-se que

um maior número de compostos foram separados com boa seletividade e resolução (Tabela 4), porém o tempo de corrida ficou mais extenso (67 minutos), e a separação não foi completa, principalmente para separação, resolução e seletividade dos flavonoides (canferol, quercetina, miricetina e rutina), sendo que o padrão interno coeluiu com o ácido siríngico, quercetina com o canferol e o ácido salicílico e a miricetina não foram identificados.

5.1.3 Ensaio 3

Como o objetivo de melhorar a separação dos flavonoides e corrigir problemas verificados com o ensaio 2, realizaram-se alterações na composição e gradiente da fase móvel, porém com as variáveis fluxo e temperatura de forno da coluna já definidos, $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e 30°C respectivamente.

Para o ensaio 3, foi utilizada uma composição de fase móvel proposta por BURIN et al. (2014), em que aumentou-se a concentração de água na mistura de eluição. Esta alteração diminuiu a força de eluição da fase móvel, o que permitiu maior interação dos compostos com a fase estacionária apolar. Neste método injetou-se uma mistura contendo 15 padrões de compostos. Esta mudança da composição trouxe melhoras significativas para a separação dos compostos, sendo ainda realizados alguns ajustes no gradiente de eluição para melhorar a separação dos componentes.

No ensaio 3, a corrida foi iniciada com uma maior concentração da fase B para reduzir o tempo de retenção de alguns compostos e consequentemente reduzir o tempo da corrida. Porém foram necessários mais alguns ajustes, pois o tempo de retenção do ácido gálico ficou muito próximo do tempo morto e em baixas concentrações comprometeu a simetria do sinal.

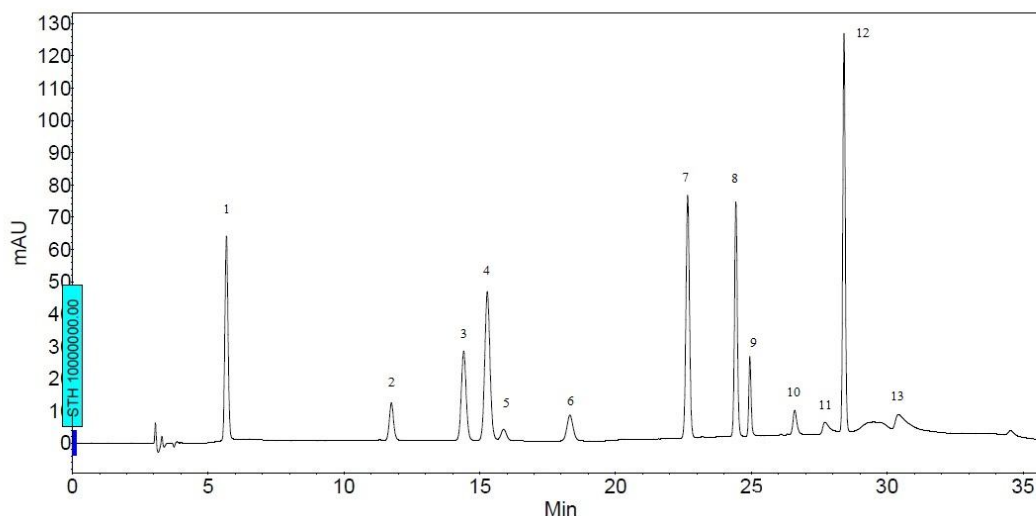


Figura 14 - Cromatograma obtido pelo ensaio 3: 1. ácido gálico, 2. catequina, 3. ácido vanílico, 4. ácido caféico, 5. Padrão Interno (PI), 6. epicatequina, 7. ácido cumárico, 8. ácido ferúlico, 9. rutina, 10. ácido salicílico, 11. miricetina, 12. resveratrol e 13. quercetina.

Observa-se que o ensaio 3 (Figura 14), ao ser comparado com os ensaios 1 e 2, apresenta maior separação dos compostos sendo possível a identificação de todos os compostos da mistura e maior seletividade e resolução, sendo que neste método todos os sinais apresentaram valores superiores ou próximos a 1,5 para resolução e a média dos valores encontrados para seletividade encontra-se na faixa do ideal (1,2) (Tabela 4). Além disso, foi possível uma redução significativa no tempo de corrida, que passou de 66 minutos para 36 minutos.

5.1.4 Condições do Método Cromatográfico – CLAE-DAD após otimização

O ensaio 3 foi definido como o mais eficiente, no entanto, apesar das mudanças realizadas, o ácido siríngico e o flavonoide canferol não puderam ser completamente separados dos demais compostos e foram retirados do método para realização da validação.

É provável que a coluna utilizada (MICROSORB-MV 100 C18) apresente limitações quanto à separação destes compostos. No entanto, o método desenvolvido foi capaz de separar completamente 12 compostos fenólicos com elevada seletividade e resolução, o que garante maior confiabilidade dos resultados

obtidos quando da identificação dos compostos fenólicos nos extratos de coprodutos agroindustriais.

E por se tratar de um método utilizado para identificação simultânea de compostos multiclassés (ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinâmicos, flavonóis e flavanóis). Normalmente só um grupo de ácidos fenólicos ou classes de flavonóides têm sido analisados por CLAE-DAD (CHENA; ZUOA; DENGGB, 2001; SILVA, 2012).

Posteriormente à definição do gradiente, o tempo de corrida foi ajustado até 45 min para tempo de reequilíbrio do sistema, sendo mantido em modo isocrático com 5% de fase B. As condições do método definido pela otimização para a realização da validação (Tabela 5), bem como o gradiente utilizado (Tabela 6), são apresentados.

Tabela 5 – Condições do método cromatográfico desenvolvido após otimização.

Parâmetros	CLAE
FASE ESTACIONÁRIA	MICROSORB-MV 100 C18 (250 x 4,6 mm - 5 µm)
FASE MÓVEL (v/v)	H ₂ O:CH ₃ COOH (98:2) H ₂ O:CH ₃ COOH:CH ₃ CN (58:2:40)
TEMPERATURA	30°C
FLUXO	1,0 mL min ⁻¹
VOLUME DE INJEÇÃO	10 µL

Tabela 6 – Gradiente Fase Móvel Metodologia CLAE-DAD.

Tempo (min)	Componente B
0,1	05 %
2,0	20 %
15	25 %
25	85 %
30	85 %
32	95 %
33	95 %
36	05 %
45	05 %

5.1.5 Condições do Detector de absorção na região do Ultravioleta e Visível

Para a identificação e quantificação dos compostos fenólicos de interesse, nas curvas de calibração e nas amostras, foi utilizado o detector de varredura ultravioleta-visível na faixa de 240 a 400 nm, e os cromatogramas foram obtidos em quatro diferentes comprimentos de onda (Figura 15), específicos para cada grupo de compostos: 280 nm, para derivados dos ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico e ácido vanílico) e para catequina e epicatequina (flavanóis) (WIJNGAARD; BRUNTON, 2010; BURIN et al, 2014; VAN LEEUW et al., 2014; TOALDO et al., 2015); 300 nm, para ácido p-cumárico, ácido salicílico e o resveratrol (estilbeno) (VAN LEEUW et al., 2014); 320 nm, para derivados dos ácidos hidroxicinâmicos (ácidos caféico e ferúlico) (MULERO; PARDO; ZAFRILLA, 2010; REBELLO et al., 2013; BARCIA et al., 2014; TOALDO et al., 2015); e 360 nm, para os flavonóis, rutina, quercetina e miricetina (WIJNGAARD; BRUNTON, 2010; MULERO; PARDO; ZAFRILLA, 2010; REBELLO et al., 2013; BARCIA et al., 2014; BURIN et al, 2014; TOALDO et al., 2015).

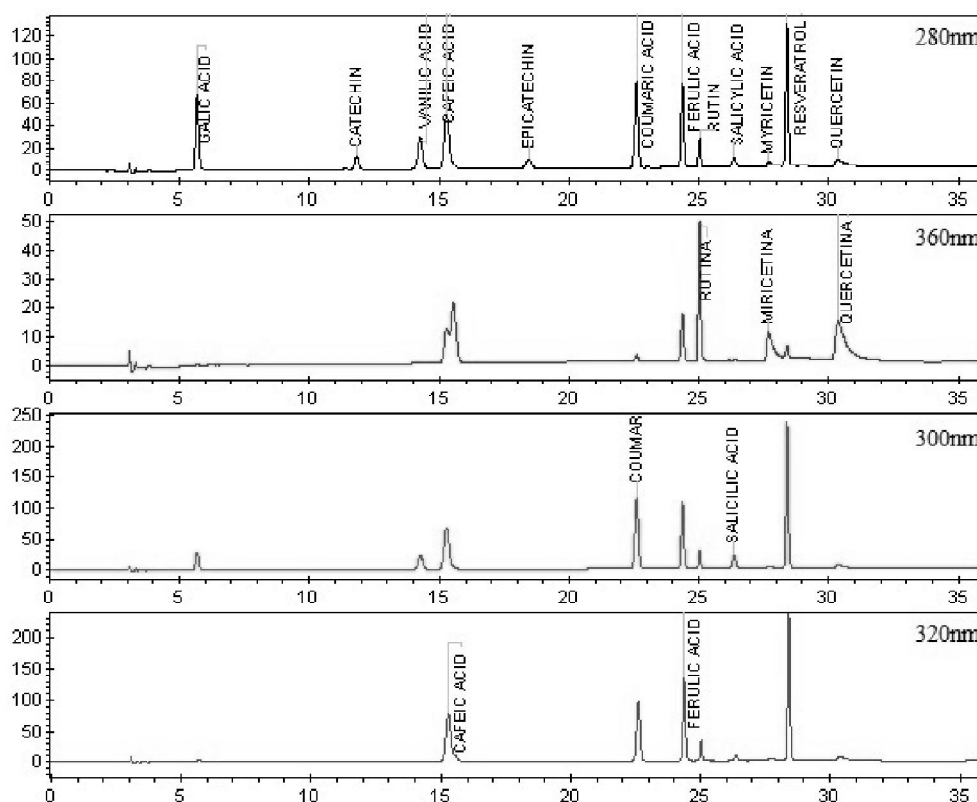


Figura 15 – Cromatogramas Mistura de Padrões (30 µg mL⁻¹) obtidos em diferentes comprimentos de onda (280, 300, 320 e 360 nm)

5.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA CLAE-DAD

5.2.1 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através da construção de curvas analíticas de calibração. A Tabela 7 apresenta os valores de coeficiente de determinação (R^2) para as equações das curvas analíticas em solvente (metanol) e nos extratos das matrizes estudadas BU, EU e BM.

Tabela 7 - Coeficiente de Determinação (R^2) das curvas analíticas

Composto	Coeficiente de Determinação (R^2)			
	Solvente	BU	EU	BM
ÁCIDO GÁLICO	0,9934	0,9993	0,9929	0,9997
CATEQUINA	0,9965	0,9959	0,9986	0,9962
ÁCIDO VANÍLICO	0,9938	0,9979	0,9954	0,9999
ÁCIDO CAFÉICO	0,9929	0,9995	0,9959	0,9994
EPICATEQUINA	0,9958	0,9779	0,9977	0,9981
ÁCIDO CUMÁRICO	0,9946	0,9995	0,9979	0,9999
ÁCIDO FERULICO	0,9921	0,9992	0,9997	0,9998
RUTINA	0,9939	0,9963	0,9995	0,9995
ÁCIDO SALICILICO	0,9942	0,9996	0,9989	0,9965
MIRICETINA	0,9883	0,9998	0,9949	0,9964
RESVERATROL	0,9906	0,9992	Não Linear	0,9995
QUERCETINA	0,9927	0,9920	0,9964	0,9981

Através dos dados apresentados é possível concluir que o modelo de regressão linear é adequado para todas as determinações analíticas em estudo, sendo que todos os compostos apresentaram-se lineares na faixa de 0,5 a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para a curva em solvente. Aproximadamente 94% das curvas analíticas apresentaram coeficiente de determinação acima de 0,99 mostrando-se de acordo com as especificações da ANVISA (0,99) e todos se apresentaram de acordo com recomendações do INMETRO, acima de 0,90.

Para as curvas elaboradas no extrato do bagaço da uva, exceto a epicatequina (0,97), todos os coeficientes apresentaram-se acima de 0,99. No engaço da uva, o trans-resveratrol não apresentou comportamento linear, não sendo possível estimar o seu coeficiente de determinação, porém para os demais compostos, todos apresentaram coeficiente acima de 0,99. As curvas obtidas para o bagaço de maçã foram as que apresentaram maiores coeficientes, sendo que para todos os compostos o coeficiente foi acima de 0,99. E para a curva elaborada em solvente, a miricetina foi o único composto que apresentou R^2 abaixo de 0,99.

5.2.2 Limites de Detecção e Quantificação

Os valores obtidos dos LD e LQ (Tabela 8) foram calculados através dos parâmetros das curvas analíticas em solvente e nos extratos das matrizes (BU, EU e BM), conforme equações Item 4.5.2.

Tabela 8 – Limites de Detecção e Quantificação das Curvas Analíticas preparadas em solvente e na matriz.

Composto	Solvente		Bagaço Uva		Engaço		Bagaço Maçã	
	LD	LQ	LD	LQ	LD	LQ	LD	LQ
ÁCIDO GÁLICO	0,389	1,297	0,633	2,111	1,169	3,897	0,068	0,228
CATEQUINA	0,738	2,461	4,291	14,30	1,288	4,294	0,406	1,354
ÁCIDO VANÍLICO	0,603	2,009	0,956	3,185	0,086	0,288	0,048	0,160
ÁCIDO CAFÉICO	0,102	0,340	0,630	2,100	0,128	0,429	0,050	0,168
EPICATEQUINA	0,807	2,690	0,059	0,195	8,456	28,17	2,639	8,797
ÁCIDO CUMÁRICO	1,071	3,569	0,183	0,609	0,256	0,853	0,025	0,082
ÁCIDO FERULICO	0,047	0,155	0,849	2,829	0,820	2,734	0,350	1,167
RUTINA	0,106	0,352	0,388	1,292	0,325	1,083	0,415	1,383
ÁCIDO SALICILICO	0,834	2,780	0,987	3,291	6,597	21,99	0,436	1,453
MIRICETINA	1,464	4,880	0,267	0,890	0,885	2,950	0,154	0,514
RESVERATROL	0,411	1,370	0,113	0,378	ND	ND	0,089	0,297
QUERCETINA	0,088	0,294	2,414	8,048	0,767	2,557	0,428	1,426

Valores expressos em $\mu\text{g mL}^{-1}$. ND = Não Determinado.

Os menores valores calculados para os limites de detecção e quantificação na curva no solvente foram para o ácido ferulico, seguido da quercetina e ácido cafeico e os maiores limites foram calculados para a miricetina (1,46 e 4,88 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para LD e LQ respectivamente) e ácido cumárico (1,07 e 3,57 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para LD e LQ respectivamente).

Para as curvas elaboradas nas matrizes foi observado que os compostos catequina e quercetina para o bagaço de uva, epicatequina e ácido salicílico para o engaço e epicatequina para bagaço de maçã, apresentaram os maiores LD e LQ. Porém compostos como o trans-resveratrol, os ácidos gálico, cafeico, cumárico e vanílico apresentaram os menores valores para detecção e quantificação.

5.2.3 Precisão

A precisão intermediária (interdias) define a capacidade do método em fornecer os mesmos resultados quando as análises são conduzidas nas mesmas condições, mas em dias diferentes (LEMOS; SANTOS; SANTOS, 2010). Em métodos de análise de traços ou impurezas ou para análises em níveis entre 10 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, são aceitos RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (RIBANI et al., 2004; BRASIL, 2011).

Tabela 9 - %RSD para as Curvas Analíticas preparadas em solvente e na matriz.

Composto	Desvio Padrão Relativo (%RSD)			
	Solvente	BU	EU	BM
ÁCIDO GÁLICO	0,36	0,68	3,56	1,99
CATEQUINA	0,32	1,86	2,00	9,66
ÁCIDO VANÍLICO	0,69	1,56	3,23	1,16
ÁCIDO CAFÉICO	5,09	1,95	2,68	0,74
EPICATEQUINA	2,22	2,31	6,53	2,40
ÁCIDO CUMÁRICO	0,73	0,62	0,69	0,34
ÁCIDO FERULICO	1,29	2,48	0,72	1,33
RUTINA	0,39	1,36	0,96	1,06
ÁCIDO SALICILICO	3,96	2,96	9,78	12,3
MIRICETINA	8,02	1,56	8,42	11,8
RESVERATROL	0,62	1,20	1,06	0,42
QUERCETINA	4,99	3,49	11,9	2,45

Os valores do desvio padrão relativo calculados (Tabela 9) para as medidas das curvas analíticas em solvente variaram entre 0,32 a 8,02%, indicando uma precisão aceitável para a validação de um método analítico, uma vez que valores de até 20% são considerados admissíveis de acordo com a literatura (LEMOS; SANTOS; SANTOS, 2010).

Para as curvas elaboradas nas matrizes (BU, EU e BM), os níveis em análise variaram para cada analito testado, dependendo da concentração esperada, variando entre (8, 15, 30 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) sendo aceitos valores de RSD de até 30% (1 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Todas as curvas avaliadas apresentam coeficientes abaixo dos limites aceitáveis para os níveis de trabalho.

Para o bagaço de uva (BU), os valores de desvio padrão relativo calculados variaram entre 0,617% a 3,49%, para o engaço (EU) os valores obtidos ficaram entre 0,687% a 11,90% e nos extratos de bagaço de maçã (BM) os valores calculados variaram de 0,338% a 12,28%.

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que os maiores valores de desvio foram obtidos para os compostos catequina, quercetina, miricetina e ácido salicílico.

5.2.4 Exatidão

Os valores de recuperação foram calculados utilizando as curvas padrão no solvente (CPS) (Tabela 10) e as curvas padrão elaboradas nas matrizes (CPM) dos três coprodutos agroindustriais (Tabela 11). Conforme recomendações, para validação em métodos cromatográficos, a recuperação em ensaios de fortificação deve ter valores entre 70 e 120% (RIBANI et al., 2004).

A partir dos resultados obtidos (Tabela 10) é possível observar que na matriz bagaço de uva, os ácidos vanílico e cumárico e a miricetina apresentaram valores de recuperação acima de 120% tanto para o extrato obtido pela extração sólido-líquido (EEBU) quanto para o extrato purificado (ELLBU). Os demais compostos apresentaram valores entre 70 e 120%, considerados satisfatórios.

Para o engaço de uva, resveratrol, catequina e os ácidos vanílico e cafeico, ficaram fora da faixa permitida, com valores de recuperação superiores a 120%. A miricetina não pode ser quantificada nas amostras de engaço de uva e apresentou valores elevados de recuperação para o bagaço de uva e maçã. Este flavonoide apresentou limites de quantificação e detecção elevados, o que pode ter dificultado a quantificação nos níveis de fortificação avaliados.

Tabela 10 – Fator de Recuperação Curva Padrão no Solvente.

Composto	% Recuperação CPS					
	EBBU	ELLBU	EBEU	ELLEU	EBBM	ELLBM
ÁCIDO GÁLICO	>120	115,2	120,9	83,0	70,8	72,8
CATEQUINA	120,7	67,9	>120	>120	>120	>120
ÁCIDO VANÍLICO	>120	>120	>120	>120	>120	>120
ÁCIDO CAFÉICO	119,0	112,7	>120	>120	<70	<70
EPICATEQUINA	>120	<70	116,3	116,4	>120	83,9
ÁCIDO CUMÁRICO	>120	>120	107,2	>120	106,3	>120
ÁCIDO FERULICO	90,4	91,5	101,2	>120	<70	86,4
RUTINA	73,0	68,1	94,1	>120	>120	>120
ÁCIDO SALICILICO	100,6	120,8	90,5	>120	119,1	>120
MIRICETINA	>120	>120	<70	<70	>120	>120
RESVERATROL	>120	>120	>120	>120	83,3	107,1
QUERCETINA	>120	108,5	117,1	>120	>120	>120

Os valores são as médias obtidas para as amostras fortificadas (25, 50 e 100%) utilizando a curva no solvente. EB = Extrato bruto (extração sólido-líquido); ELL = Extração líquido-líquido.

Para as matrizes avaliadas, poucos compostos, cerca de 6,9% apresentaram valores de recuperação inferiores a 70%, indicando que os métodos de extração avaliados apresentam boa capacidade de extrair os compostos de interesse.

A recuperação calculada para a quercetina foi de 117% no engajo de uva, enquanto o ácido cafeico apresentou recuperação de 119% para o bagaço de uva, ambos no método de extração sólido – líquido. Estes valores foram encontrados também por FRANCISCO e RESURRECCION (2009), com recuperações de 112% e 119%, obtidas para estes compostos respectivamente, em película de amendoim.

FRANCISCO e RESURRECCION (2009), também obtiveram valores de recuperação semelhantes aos obtidos para o engajo da uva para o flavonoide epicatequina (118%). Enquanto para o estilbeno resveratrol o valor obtido foi de 104%, semelhante ao calculado para o bagaço de maçã (107%).

Quando a recuperação foi calculada a partir da curva preparada na amostra (Tabela 11) foi observada uma melhor recuperação nos compostos nos extratos de bagaço de maçã, que teve valores de recuperação variando entre 65,95% e

123,25%, na maioria dentro da faixa recomendada para ensaios de fortificação. Recuperações abaixo de 70% e acima de 120% foram encontradas para extratos de engaçó de uva. Para o bagaçó de uva as recuperações próximas aos limites recomendados estão entre 67,56% e 127,18%.

Tabela 11 - Fator de Recuperação Curva Padrão na Matriz.

Composto	Recuperação CPM					
	BU		EU		BM	
	EBBU	ELLBU	EBEU	ELLEU	EBBM	ELLBM
ÁCIDO GÁLICO	105,4	>120	118,8	<70	109,4	92,1
CATEQUINA	>120	>120	>120	>120	>120	>120
ÁCIDO VANÍLICO	>120	>120	>120	>120	>120	>120
ÁCIDO CAFÉICO	>120	>120	>120	>120	<70	<70
EPICATEQUINA	>120	>120	>120	>120	90,4	72,7
ÁCIDO CUMÁRICO	84,0	97,6	>120	>120	113,0	116,2
ÁCIDO FERULICO	72,0	69,4	76,2	112,8	85,8	87,4
RUTINA	109,5	72,4	<70	<70	115,5	>120
ÁCIDO SALICILICO	75,3	101,8	<70	<70	105,4	>120
MIRICETINA	70,0	105,8	<70	<70	104,0	87,2
RESVERATROL	<70	116,9	<70	<70	119,3	118,3
QUERCETINA	<70	>120	>120	>120	118,4	>120

Os valores são as medias obtidas para as amostras fortificadas (25, 50 e 100%) utilizando as curvas nas matrizes. EB = Extrato bruto (extração sólido-líquido); ELL = Extração líquido-líquido.

Valores elevados de recuperação podem ser justificados pela presença natural desses compostos nas matrizes estudadas. Como essas matrizes são produtos naturais, a concentração de compostos fenólicos pode variar dependendo da amostragem ou procedimento de extração, ou até mesmo a presença de outros compostos como antocianinas no bagaçó de uva, que poderiam interferir na identificação quando utiliza-se o detector de absorção na região do Ultravioleta visível, resultando em um valor de recuperação superestimado para o composto FRANCISCO e RESURRECCION (2009).

Além disso, os compostos catequina, epicatequina e os isômeros de resveratrol, que apresentaram valores de %R fora da faixa recomendada ($70 < \%R < 120\%$), para as curvas elaboradas nas matrizes (Tabela 11) são altamente fluorescentes. Portanto, a sensibilidade do procedimento poderia ser melhorada utilizando um detector de fluorescência (PORGALI; BÜYÜKTUNCEL, 2012).

A partir das curvas analíticas é possível também obter a sensibilidade do método para cada composto analisado, através da inclinação das curvas (coeficiente angular) (Tabela 12).

Tabela 12 - Coeficiente angular das curvas analíticas preparadas em solvente e na matriz.

Composto	Coeficiente Angular			
	Solvente	BU	EU	BM
ÁCIDO GÁLICO	0,2814	0,3171	0,2580	0,3717
CATEQUINA	0,0671	0,0493	0,0736	0,0585
ÁCIDO VANÍLICO	0,1857	0,2301	0,2347	1,9516
ÁCIDO CAFÉICO	0,5114	0,3397	0,7811	0,8103
EPICATEQUINA	0,0684	0,0290	0,0432	0,0501
ÁCIDO CUMÁRICO	0,5583	0,8678	0,9246	0,9276
ÁCIDO FERULICO	0,5131	0,7451	0,7861	0,1085
RUTINA	0,1551	0,2372	0,2343	0,226
ÁCIDO SALICILICO	0,1026	0,1131	12,2929	0,7231
MIRICETINA	0,0738	0,3574	0,2961	0,3560
RESVERATROL	0,8151	0,8557	ND	0,9650
QUERCETINA	0,2040	0,3230	0,3518	0,3271

Valores expressos em $\mu\text{g mL}^{-1}$. ND = não determinado.

É possível sugerir que para as curvas elaboradas em solvente, catequina, epicatequina e miricetina apresentaram os menores valores para sensibilidade, isso indica que variações na concentração do analito resultam em pequena variação no sinal analítico avaliado (áreas do sinal cromatográfico), o que pode influenciar nos cálculos de recuperação. Nas curvas padrão preparadas nas matrizes catequina e epicatequina também apresentaram baixa sensibilidade.

Para a matriz bagaço de uva, as melhores recuperações calculadas, foram obtidas com a curva elaborada na própria matriz (CPM) a partir do extrato bruto

(EBBU). Para o engaço de uva, os resultados mais satisfatórios (dentro das recomendações) foram obtidos com a curva analítica preparada em solvente (CPS), utilizando também o extrato bruto (EBEU). Para o bagaço de maçã, tanto o extrato bruto (EBBM) quanto o extrato purificado (ELLBM), apresentaram valores de recuperação dentro da faixa determinada, porém com melhores resultados calculados para a curva analítica elaborada na matriz (CPM).

Com base nos ensaios de exatidão do método, pode-se concluir que os extratos brutos obtidos pela extração sólido-líquido (ESL) apresentam resultados mais satisfatórios para as três matrizes analisadas (EBBU, EBEU e EBBM). Atualmente diversas técnicas de extração de compostos fenólicos têm sido apresentadas por diversos autores, porém as técnicas mais amplamente utilizadas são a Extração Sólido-Líquido (ESL) e a Extração Líquido-Líquido (ELL) (CABRERA et al., 2012; COELHO, 2013; FONTANA; BOTTINI, 2014; OLIVEIRA, 2014).

SANT'ANNA et al. (2011) estudaram a cinética de extração de compostos fenólicos totais e antocianinas no bagaço da uva, utilizando etanol:água como solvente extrator, e a melhor concentração de etanol a ser utilizada na extração foi de 50% com uma proporção sólido:solvente de 1 g de bagaço de uva e 50 mL de solvente.

DOMÍNGUEZ-PERLES et al. (2014) também avaliaram os efeitos tempo (10-30 minutos), temperatura (25-95°C) e concentração de etanol (5-90 %) sobre a extração de compostos fenólicos do engaço de uva. Utilizando metodologia de superfície resposta pelo método do radical ABTS. Os dados gerados permitiram estabelecer as condições ótimas de extração em 23,0 min; 95,0°C e 57,9:42,1 da mistura de solventes etanol:água para uva branca e 23,4 min; 84,2°C e 63,8:36,2 etanol:água para a uva tinta.

KARACABEY E MAZZA, 2010, realizaram estudos para otimizar a atividade antioxidante dos extratos de hastes de uva moída (*Vitis vinifera*, variedade Pinot noir) por extração sólido-líquido, também utilizando a metodologia de superfície de resposta, utilizando como variáveis dependentes os métodos de TEAC e ORAC. Esse estudo mostrou que os principais efeitos: concentração de etanol e temperatura são estatisticamente significativos, enquanto que a proporção de solvente sólido não foi significativa ($p > 0,05$). Sendo a extração com a concentração de etanol de 55,4% em 83,6°C resultou na atividade antioxidante mais elevada.

Em seus estudos, WIJNGAARD e BRUNTON (2010) utilizaram a metodologia de superfície de resposta, para avaliar dois solventes de qualidade alimentar (acetona e etanol), na extração do bagaço de maçã gerado industrialmente. O objetivo principal do processo de otimização foi maximizar a atividade antioxidante em extratos. Isto foi medido utilizando o Ensaio DPPH, que resultou um protocolo ideal para a extração de etanol 56 % a 80°C durante 31 min.

Em nossos estudos, tanto ESL quanto a ELL mostraram-se eficientes, sendo capazes de extrair compostos fenólicos dos três coprodutos. Porém, dificuldades para a quantificação destes compostos são comuns devido à complexidade da composição de matrizes de produtos naturais, como os coprodutos (BU, EU e BM) e também em função dos baixos níveis de concentração em que os compostos fenólicos investigados podem ser encontrados nessas materiais.

Em seus estudos BURIN et al., (2014) realizaram uma comparação aplicando quatro métodos de extração distintos (ELL, SPE, Ultrassom e QuEChERS) para amostras de vinho, avaliando por CLAE-DAD as áreas de sinais médios para cada composto fenólico analisado (ANOVA). A ELL foi o método mais eficiente para a extração de polifenóis a partir das amostras avaliadas pois apresentou a melhor precisão, com os maiores valores de recuperação para todos compostos avaliados (80,1 - 95,6%) e melhor repetibilidade (RSD%), além disso mostrou-se um método de fácil aplicação, que oferece simplicidade e curto tempo de extração (5 min.) (BURIN et al., 2014).

5.2.5 Aplicação da Metodologia CLAE-DAD após Validação

Após a otimização e validação da metodologia cromatográfica, extratos dos três coprodutos agroindustriais foram avaliados para identificar e quantificar os compostos fenólicos em estudo (Tabela 13). Como os melhores resultados para recuperação foram obtidos a partir do extrato bruto, este foi escolhido para avaliar as amostras.

Tabela 13 – Identificação e Quantificação de Compostos Fenólicos nos extratos de coprodutos Agroindustriais

Extrato	Composto Identificado	Equação de Retra (CPS)	TR	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	($\mu\text{g g}^{-1}$)
BU	Ácido Gálico	$y=0,2790x+0,4560$	5,10	$7,28\pm0,06$	91,00
	Catequina	$y=0,0669x+0,0736$	10,5	$66,22\pm0,79$	827,8
	Epicatequina	$y=0,0682x+0,0561$	16,1	$33,36\pm2,51$	417,0
	Miricetina	$y=0,0713x-0,1344$	27,1	$5,74\pm0,31$	71,75
	Quercetina	$y=0,2017x+0,1458$	29,8	$2,63\pm0,15$	32,88
EU	Ácido Gálico	$y=0,2790x+0,4560$	5,60	$0,935\pm4,45$	11,69
	Catequina	$y=0,0669x+0,0736$	10,7	$32,33\pm1,14$	404,1
	Epicatequina	$y=0,0682x+0,0561$	16,5	$22,50\pm0,49$	281,3
	Rutina	$y=0,1547x+0,2600$	24,9	$21,02\pm0,35$	262,8
	Quercetina	$y=0,2017x+0,1458$	29,8	$2,09\pm0,10$	26,13
BM	Catequina	$y=0,0669x+0,0736$	13,0	$14,52\pm2,19$	181,5
	Epicatequina	$y=0,0682x+0,0561$	17,0	$4,71\pm0,52$	58,88
	Rutina	$y=0,1547x+0,2600$	24,8	$4,57\pm0,13$	57,13

Equação de reta obtida através da elaboração das curvas analíticas em solvente. Os resultados são a média \pm desvio padrão (n=3) para os extratos brutos (ESL).

No extrato de bagaço de uva (Figura 16), foram identificados o ácido gálico, e os flavonoides catequina, epicatequina, miricetina e quercetina. Sendo que os flavanóis (catequina e epicatequina) estão presentes em maior quantidade, quando comparadas com os demais compostos (MULERO; PARDO; ZAFRILLA, 2010; MELO et al., 2011; BURIN et al., 2014).

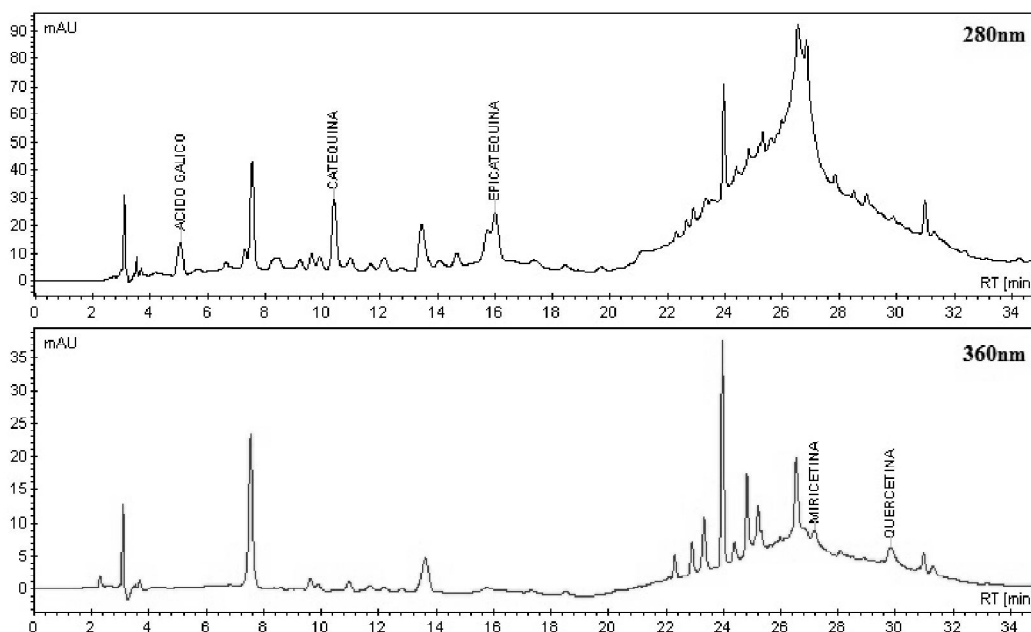


Figura 16 – Cromatogramas Bagaço de Uva - Extração Sólido-Líquido

ROCKENBACH et al. (2011a), também relataram a presença de ácido gálico, catequina, epicatequina, miricetina e quercetina, em extratos de bagaço de uva *Vitis vinifera*. NATIVIDADE et al. (2013), em seus estudos identificaram os mesmos compostos em suco de uva.

ABE et al. (2007) analisaram duas cultivares de *Vitis labrusca* (Niágara rosada, Folha de figo) e três cultivares de *Vitis vinifera* (Syrah, Merlot e Moscato Embrapa). Sendo que quercetina, catequina e epicatequina foram encontradas em todas as cultivares analisadas. Na cultivar Niágara rosada, catequina e epicatequina apresentaram teores que variaram entre 3,8 e 61 mg 100 g⁻¹ (cerca de 80 a 90% do total de flavonoides). Enquanto a quercetina foi encontrada em quantidade relativamente baixa.

Resultados semelhantes também foram obtidos em extratos de bagaço de uva por SAGDIC et al. 2011. Dentre os ácidos fenólicos, os principais compostos identificados foram o ácido clorogênico e o ácido gálico (valor médio de 1090 µg g⁻¹). Entre os flavonoides, catequina foi o composto majoritário quantificado.

No extrato de engaçõ de uva (Figura 17) foram identificados os compostos ácido gálico, catequina, epicatequina, rutina e quercetina. Catequina, epicatequina e quercetina foram relatadas também por BARROS et al. 2014, em engaçõ de uva *Vitis vinifera*.

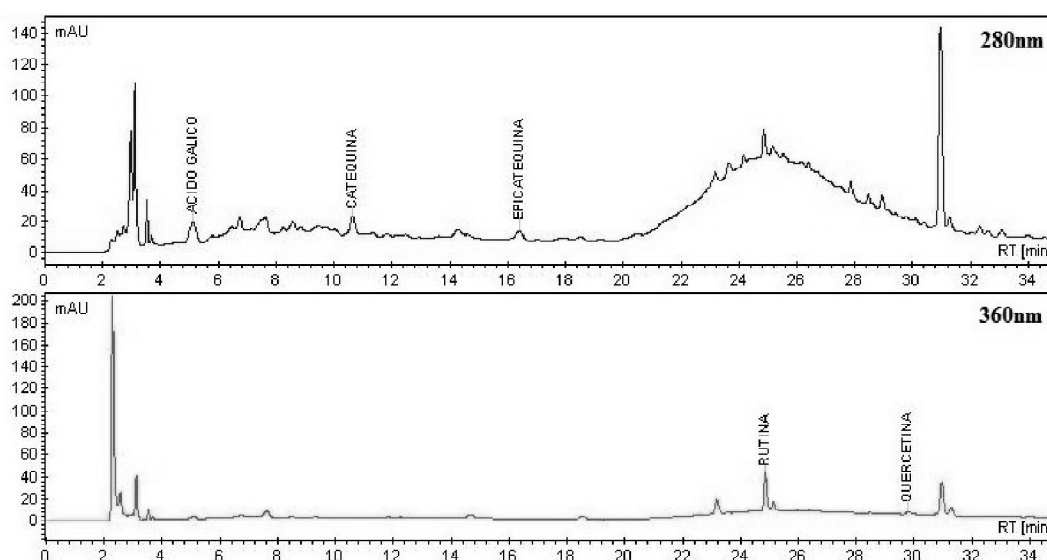


Figura 17 - Cromatogramas Engaçõ de Uva - Extração Sólido-Líquido

Flavonoides como a catequina e epicatequina estão presentes principalmente nas sementes de uvas e são as principais responsáveis pelo sabor e adstringência

de vinhos e sucos de uva, estes foram encontrados também com elevados teores em bagaço e engaço de uva.

Além disso, esses compostos têm demonstrado elevado potencial antioxidante e inibição da proliferação celular. Há ainda evidências de que a ingestão de flavonoides está associada à redução da oxidação do LDL e à redução da agregação plaquetária, contribuindo para a diminuição da progressão da lesão aterosclerótica (ABE et al., 2007; IACOPINI et al., 2008).

Para o bagaço de maçã (Figura 18), os flavonoides catequina, epicatequina e rutina foram identificados. Sendo a catequina o composto presente em maior quantidade ($181,5 \mu\text{g g}^{-1}$).

Resultados semelhantes foram encontrados por ALBERTI et al (2014) que investigaram a variedade de maçã Gala e dentre os compostos fenólicos analisados, catequina e epicatequina também foram identificados.

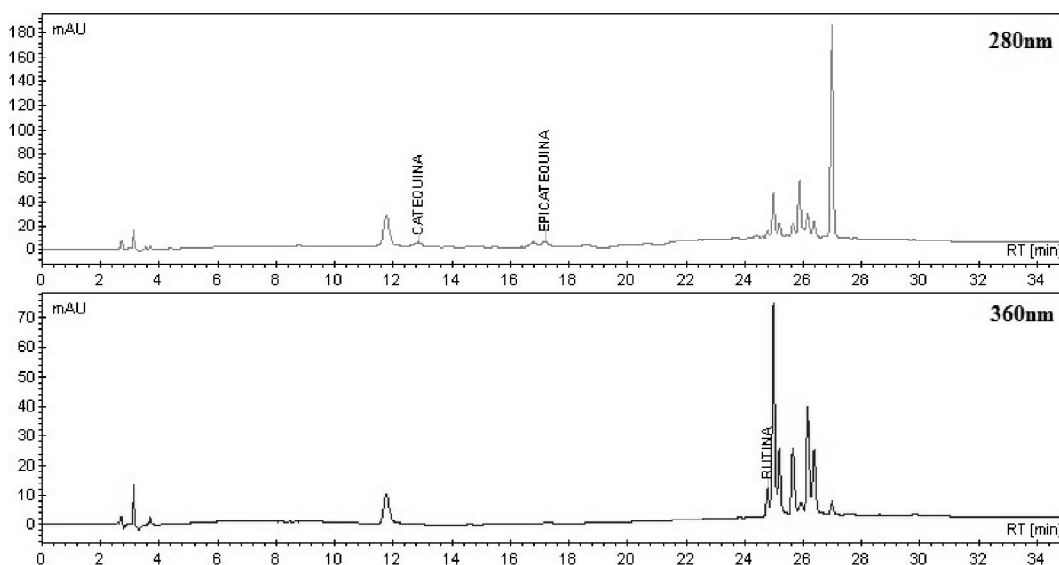


Figura 18 - Cromatogramas Bagaço de Maçã - Extração Sólido-Líquido

Dentre os compostos fenólicos estudados, o ácido gálico e quercetina foram identificados nos extratos de bagaço e engaço de uva. Miricetina foi identificada no extrato de bagaço de uva, rutina nos extratos de engaço e bagaço de maçã e catequina e epicatequina estiveram presente nos três coprodutos. Todos os compostos quantificados apresentaram teores acima dos seus respectivos Limites de Quantificação para a Curva elaborada em solvente (Tabela 8).

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.3.1 Análise de Compostos Fenólicos Totais e Atividade Antioxidante pelos métodos de sequestro dos radicais DPPH e ABTS, Redução do Ferro e (FRAP) e capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC)

Para se determinar a atividade antioxidante em extratos vegetais são utilizados, idealmente, métodos que apresentam princípios reacionais distintos, o que permite um conhecimento mais amplo das características antioxidantes do material em estudo. (VILLAÑO et al., 2005; INFANTE, 2013). A avaliação dos teores de Compostos Fenólicos Totais, a determinação da atividade antioxidante pelos métodos de sequestro dos radicais ABTS e DPPH, redução do ferro e capacidade de absorção de radicais oxigênio foram realizadas utilizando os extratos dos três coprodutos agroindustriais, bagaço de uva (BU), engaço de uva (EU) e bagaço de maçã (BM) (Tabela 14).

Tabela 14 – Resultados dos ensaios de atividade antioxidante dos extratos de coprodutos agroindustriais.

	FT mg EAG g⁻¹	DPPH μmol TEAC g⁻¹	ABTS μmol TEAC g⁻¹	FRAP μmol FeSO₄ g⁻¹	ORAC μmol TEAC g⁻¹
BU	33,9±1,26 b	212,7±15,6 b	445,1±31,1 b	589,1±7,99 b	1642,3±16,0* a
EU	52,0±1,25 a	241,6±6,78 a	628,8±14,2 a	855,6±6,93 a	1635,6±26,4* a
BM	8,32±0,06 c	123,8±9,24 c	212,2±12,7 c	174,2±4,58 c	327,22±24,9* b

Os resultados são a média ± desvio padrão (n=3); Para uma mesma coluna, as médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

FT = Fenólicos Totais; EAG = equivalente de ácido gálico; TEAC = capacidade antioxidante equivalente ao trolox; FeSO₄ = Sulfato ferroso; * (extrato liofilizado diluído em tampão fosfato de potássio).

Com base no Teste de Tukey realizado (95% de confiança), foram observadas diferenças significativas entre os três coprodutos, nos testes de

Fenólicos Totais, DPPH, ABTS e FRAP. Para o ensaio ORAC, não houve diferença significativa entre o bagaço e engaço de uva.

Observando os valores médios encontrados podemos concluir que o extrato do engaço de uva apresentou o maior teor de compostos fenólicos totais e as maiores atividades antioxidante para os ensaios DPPH, ABTS e FRAP, o mesmo também foi observado por SPIGNO E DE FAVERI (2007).

SOARES et al. (2008b) avaliaram o conteúdo de compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante do extrato da casca de uva Isabel (*Vitis labrusca*), produzido com acetona 75%, e obtiveram resultados médios de 1026,7 mg EAG 100 g^{-1} de peso seco. A atividade antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH foi de 89,22 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ e 197,0 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ de amostra respectivamente, valores inferiores aos obtidos neste estudo.

Em seus estudos ROCKENBACH et al., 2011(a), avaliaram o teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante do bagaço de uvas tintas das variedades Cabernet Sauvignon e Merlot (*Vitis vinifera*), Bordeaux e Isabel (*Vitis labrusca*). O bagaço da variedade Cabernet Sauvignon, foi o que apresentou o maior teor de compostos fenólicos totais e a maior atividade antioxidante (485,42 e 505,52 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ para os métodos ABTS e DPPH respectivamente). Para a variedade Isabel, os resultados foram de 32,62 mg EAG g^{-1} para compostos fenólicos totais e 188,02 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ para o método de sequestro do radical DPPH, semelhante aos obtidos neste estudo.

Diferentes sistemas solventes foram aplicados por ROCKENBACH (2008) para determinar a eficiência de extração de compostos com capacidade antioxidante em extratos de bagaço de uva *Vitis vinifera* (variedades Tannat e Ancelota), provenientes da região de Videira, Santa Catarina. Os valores obtidos para teores de compostos fenólicos totais dos extratos (em etanol 50%) de bagaço de uva foram para variedade Ancelota 7,32 e Tannat 5,84 (g EAG 100 g^{-1} peso seco), valores superiores ao deste estudo. E a atividade antioxidante pelo método do radical ABTS 400,7 e 341,5 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ para as mesmas amostras.

Diferenças no teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante podem ser devido às variações entre as espécies e cultivares analisados, condições climáticas e diferenças entre os métodos de extração também podem influenciar no teor destes compostos. (SAGDIC et al., 2011). Poucas informações sobre os compostos fenólicos e atividade antioxidante de resíduos de uvas americanas (*Vitis*

labrusca L.) estão presentes na literatura atual, a maioria dos estudos diz respeito a resíduos de uvas para produção de vinhos finos (*Vitis vinifera* L.) em países tradicionais, como os da Europa. No entanto, os resultados mostram que os resíduos das uvas *Vitis labrusca* possuem igual ou maior teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante quando comparados às uvas mais relatadas (*Vitis vinifera*) (BURIN et al., 2014).

Durante o processo de vinificação, outras partes do conjunto da uva são desperdiçadas, como os engaços, e recebem menos atenção. Porém diversos estudos mostram que o engaço de uva apresenta uma quantidade importante de polifenóis, alta atividade antioxidante e tem demonstrado ser uma fonte rica de compostos bioativos (SPIGNO; DE FAVERI, 2007; ROCKENBACH, 2008; KARACABEY; MAZZA, 2010).

KARACABEY E MAZZA, 2010, avaliaram o engaço de uva (*Vitis vinifera*, variedade Pinot noir) pelos métodos ABTS e ORAC, e obtiveram resultados de ABTS que variaram de 85,6 - 238,6 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ de amostra seca e ORAC variaram entre 308,4 - 1302,7 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ de amostra seca.

O bagaço de maçã, apresentou valores inferiores para o teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, quando comparados aos coprodutos da vinificação (bagaço e engaço de uva) porém, também pode ser considerado um coproduto que apresenta potencial antioxidante e que pode ser utilizado na recuperação dos recursos naturais antioxidantes, sob a forma de polifenóis. Este fato também foi observado por SOARES et al., 2008 (a)(c); WIJNGAARD; BRUNTON 2010; ALBERTI et al., 2014.

Nos estudos apresentados por WIJNGAARD e BRUNTON (2010), que avaliaram a atividade antioxidante pelo método DPPH e o teor de compostos fenólicos do bagaço de maçã. Utilizando 56% etanol, 80°C e 27 min para extração dos compostos, encontraram valores de 449 mg Trolox 100 g^{-1} para o DPPH e 1092 mg EAG 100 g^{-1} para compostos fenólicos totais.

Conforme os resultados apresentados por SOARES et al. (2008(a)), o conteúdo de fenólicos totais que permanece no bagaço de maçã é elevado (134,45 a 522,74 mg EAG 100 g^{-1}), e atividade antioxidante para ABTS 25,46 e para o DPPH 39,15 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ de amostra., sendo que os valores encontrados em nosso estudo são superiores, indicando elevado potencial antioxidante nos extratos de bagaço de maçã analisados.

5.3.2 Estabilidade Oxidativa – Método RANCIMAT

A estabilidade oxidativa do óleo de soja, pelo método Rancimat, foi realizada utilizando os extratos dos três coprodutos agroindustriais, bagaço de uva (BU), engaço de uva (EU) e bagaço de maçã (BM) (Item 4.3.1) e o coproduto liofilizado (pó). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Período de Indução e Fator de Proteção dos extratos de coprodutos em Óleo de soja pelo Método Rancimat

AMOSTRA	PI (horas)	% FP
Extrato BU	7,973±0,883 b	109,88
Extrato EU	7,827±0,159 b	107,85
Extrato BM	14,49±2,909 a	199,63
Resíduo BU	7,267±0,057 b	100,14
Resíduo EU	7,097±0,180 b	97,80
Resíduo BM	11,81±0,392 a	162,70
Óleo de Soja	7,257±0,208 b	100,00
TBHQ	12,60±0,484 a	173,68

Os resultados dos períodos de indução (PI) são a média ± desvio padrão (n=3).

Este método é um teste de oxidação acelerada, que determina a estabilidade de óleos e gorduras. O período de indução é caracterizado pela mudança da condutividade da água deionizada devido aos produtos gerados pela oxidação. O processo é realizado sob altas temperaturas e constante aeração (TREMOCOLDI, 2015).

Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, as médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tabela 17). É possível observar que tanto os extratos como os resíduos de bagaço e engaço de uva não apresentaram diferenças significativas entre si e quando comparados com o óleo de soja puro. Já o extrato do bagaço de maçã e o produto liofilizado apresentaram maior potencial em proteger o óleo da oxidação lipídica, não apresentado diferença significativa quando comparado ao antioxidante sintético TBHQ.

O período de tempo necessário para o início da oxidação do óleo de soja puro, sem adição de antioxidantes (controle) foi de 7,26h. O extrato de bagaço de maçã apresentou o maior período de indução (14,49h), com um FP de 199,6%, estando acima do TBHQ (12,6h).

HE; LU; LIVIU (2015) avaliaram a estabilidade oxidativa de extratos de maçã, para testar três diferentes métodos de extração (ultrassom, micro-ondas e banho-maria). Os períodos de indução de oxidação dos polifenóis extraídos da maçã pelos métodos assistidos por micro-ondas, ultrassom e banho de água foram 6,11, 3,26 e 4,13 h, respectivamente. Os autores relacionam os baixos valores encontrados à oxidação dos polifenóis da maçã, causada pelas ondas e a alta temperatura da solução e ao longo período de tempo de extração. Em nossos estudos o período de indução encontrado foi superior, o que pode estar relacionado com a diferença na metodologia de extração. Os extratos foram preparados em banho-maria a 75°C, com tempo de extração igual 35 min, mostrando-se mais eficiente.

LUZIA e JORGE (2010) avaliaram extratos de sementes de limão (galego e cravo) aplicados ao óleo de soja. E apresentaram médias da estabilidade oxidativa (períodos de indução) para o Limão Cravo 13,74h e Limão Galego 14,37h.

5.3.3 Atividade antioxidante CLAE-FR-ABTS^{•+} *on-line*

O método de atividade antioxidante CLAE-FR-ABTS^{•+} *on-line* é um método que visa à separação de compostos e sua atividade antioxidante simultaneamente (HE et al., 2010).

A análise da atividade antioxidante pelo sequestro do radical ABTS^{•+} por CLAE-FR-ABTS^{•+} *on-line* foi realizada com a injeção dos extratos de coprodutos agroindustriais (Item 4.3.1). Por meio das técnicas de determinação simultânea de compostos fenólicos e atividade antioxidante *on-line* foi possível a identificação e a quantificação, de acordo com o tempo de retenção e espectros de absorção, de 4 compostos fenólicos: ácido gálico, catequina, epicatequina e rutina, nos três coprodutos agroindustriais (Tabela 16 e Figuras 17, 18 e 19). Os compostos individuais foram avaliados quanto à atividade antioxidante em $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$, utilizando curva analítica ($y = 38628x - 67406$; $R^2 = 0,9968$).

Tabela 16 – Atividade antioxidante dos compostos fenólicos por CLAE-*on line*.

Extrato		Composto	TR	$\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$	%CV
BU	1	Ácido Gálico	7,40	306 \pm 10,5	3,42
	2	NI	9,80	315 \pm 1,52	0,48
	3	Catequina	15,3	463 \pm 2,60	0,56
	4	NI	18,9	168 \pm 33,5	19,99
	5	Epicatequina	22,9	773 \pm 65,7	8,51
EU	1	Ácido Gálico	7,40	165 \pm 10,2	6,18
	2	NI	8,80	70,8 \pm 1,27	1,80
	3	NI	9,90	116 \pm 7,12	6,13
	4	NI	12,6	291 \pm 55,0	18,92
	5	Catequina	15,3	244 \pm 9,45	3,87
	6	NI	18,9	111 \pm 15,6	14,07
	7	Epicatequina	22,9	214 \pm 9,86	4,60
	8	NI	26,7	96,2 \pm 6,51	6,77
	9	Rutina	27,2	43,4 \pm 3,12	7,19
BM	1	NI	12,5	61,1 \pm 6,6	10,86
	2	Catequina	15,9	187 \pm 4,73	2,52
	3	NI	18,9	130 \pm 15,7	12,11
	4	Epicatequina	22,9	183 \pm 3,57	1,95
	5	NI	24,1	179 \pm 4,34	2,42
	6	Rutina	27,3	125 \pm 3,69	2,95
	7	NI	27,9	52,5 \pm 2,86	5,44
	8	NI	28,0	84,8 \pm 4,90	5,78

Resultados da atividade antioxidante ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$) são a média \pm desvio padrão (n=3).

NI: não identificado.

Para o bagaço de uva (Figura 19), alguns compostos apresentaram atividade antioxidante, sendo que o ácido gálico, catequina e epicatequina apresentaram elevado potencial.

A atividade antioxidante para catequina e epicatequina por CLAE *on line* para o bagaço de uva, foi maior do que a encontrada nos outros coprodutos, o que mostra que o elevado potencial antioxidante destes compostos nessa matriz relaciona-se também com os elevados níveis quantificados desses compostos.

Todos os sinais que apresentaram capacidade antioxidante foram detectados em 734nm, comprimento de onda que é específico para identificação da reação do radical ABTS. Porém para os compostos miricetina e quercetina não foi possível a leitura de um sinal de atividade, devido a este comprimento de onda não específico

para os flavonoides e possivelmente pela presença de demais compostos na matriz, como antocianinas.

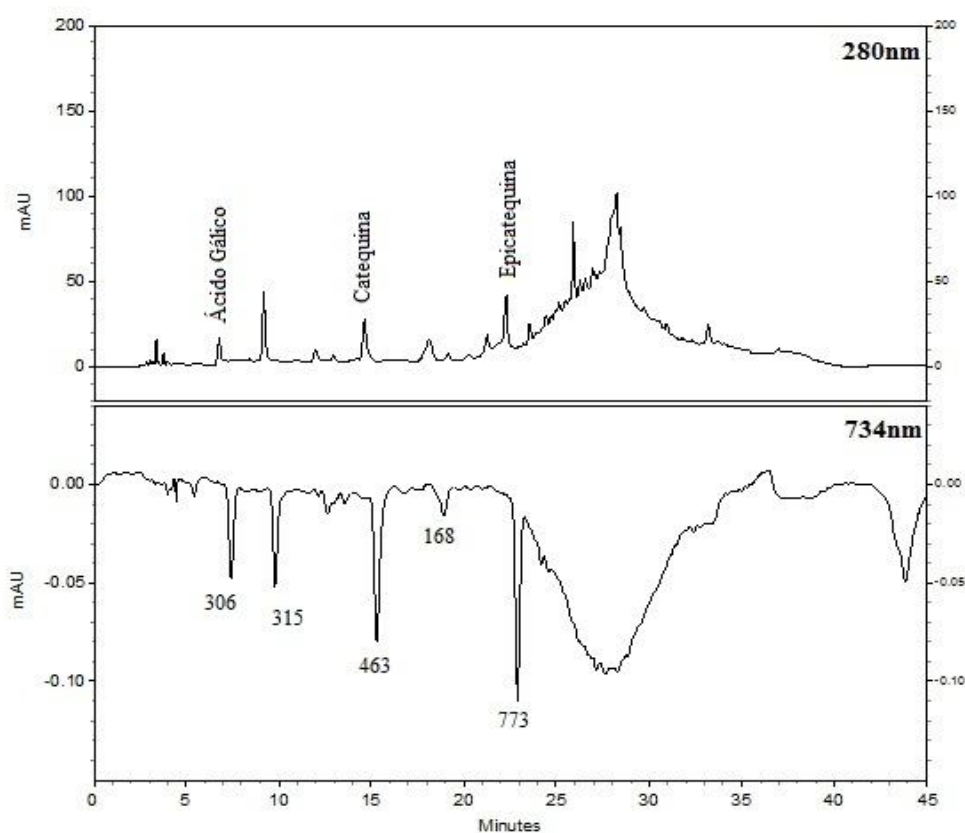


Figura 19 – Cromatograma Extrato Bagaço de Uva – 280 nm e Cromatograma CLAE-FR-ABTS⁺⁺ on-line 734 nm para Extrato Bagaço de Uva.

Nos extratos do engaço de uva (Figura 20), verificou-se a atividade antioxidante dos compostos ácido gálico, catequina, epicatequina e rutina. E também em diversos sinais, de compostos não identificados. O que justifica o elevado potencial antioxidante do extrato, o que pode estar relacionado com seu igualmente elevado conteúdo de compostos fenólicos, com atividade antioxidante (BURIN et al., 2014).

Estudos apresentados por SPIGNO; DE FAVERI (2007) e BARROS et al. (2014), também relatam catequina e epicatequina como compostos presentes no engaço de uvas.

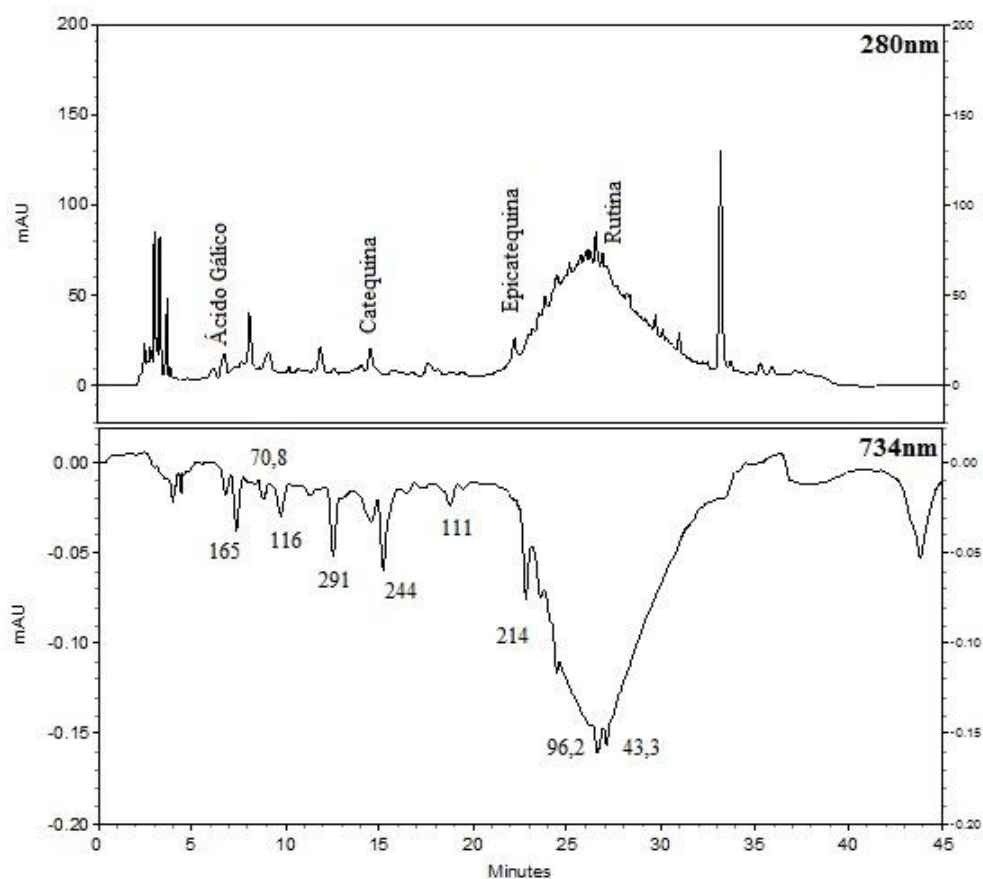


Figura 20 - Cromatograma Extrato Engaço de Uva – 280 nm e Cromatograma CLAE-FR-ABTS on-line 734 nm para Extrato Engaço de Uva.**

Para o bagaço de maçã (Figura 21) os compostos identificados catequina, epicatequina e rutina apresentaram as maiores atividades antioxidantes. Além destes, foram observados sinais no cromatograma que não puderam ser identificados com os padrões disponíveis, mas que também apresentaram elevada atividade. Estes compostos contribuem com a atividade total do extrato.

Os compostos catequina e epicatequina foram também identificados em extrato de bagaço de maçã por ALBERTI et al. (2014).

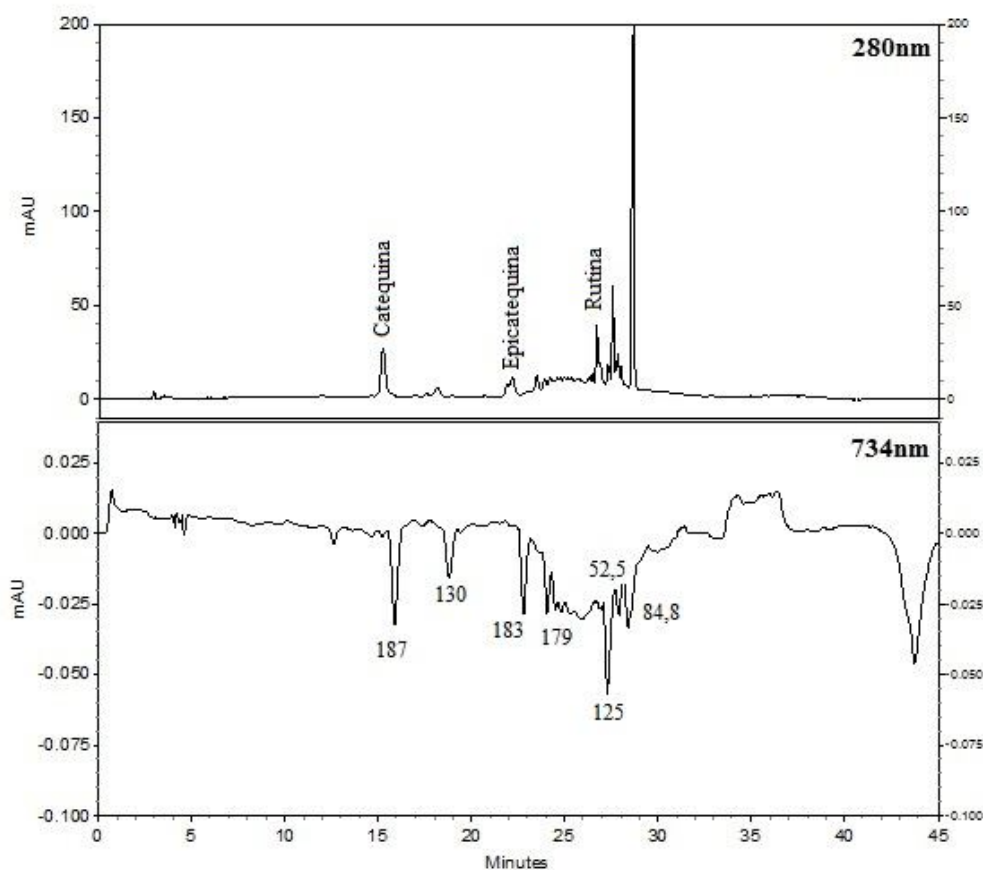


Figura 21 - Cromatograma Extrato Bagaço de Maçã – 280 nm e Cromatograma CLAE-FR-ABTS⁺ *on-line* 734 nm para Extrato Bagaço de Maçã.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A concentração inibitória mínima realizada com extratos dos coprodutos agroindustriais (BU, EU e BM) nas concentrações entre 72 mg mL⁻¹ a 1,87 mg mL⁻¹) não apresentaram inibição contra as bactérias testadas (*Staphylococcus aureus* e *Salmonella bongori*).

Os controles utilizados etanol:água 50:50 e etanol:água 65:45 (v/v); não apresentaram inibição contra as bactérias testadas, enquanto o antibiótico clorofenicol 1,2 mg mL⁻¹, apresentou inibição, sendo visualizada pela forte coloração azul, característica da reação da resarsurina com as células bacterianas.

Os extratos dos três coprodutos nas concentrações testadas não apresentaram inibição do crescimento bacteriano, sendo considerado os mesmos

valores de CIM > 72,0 mg mL⁻¹ para BU, EU e BM. Sendo assim, recomenda-se a realização de novos ensaios de CIM, para os coprodutos com concentrações de extratos acima de 72,0 mg mL⁻¹, para estabelecer as concentrações inibitória e bactericida mínimas.

6 CONCLUSÕES

A metodologia CLAE-DAD proposta demonstrou ser eficiente, apresentando bons resultados de precisão para a maioria dos compostos avaliados. Os limites de detecção calculados foram baixos, variando entre 0,0025 e 6,59 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e os limites de quantificação do método variaram entre 0,155 e 28,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, permitindo que níveis baixos de compostos fenólicos sejam identificados e quantificados.

Alguns compostos são altamente fluorescentes, como a catequina, epicatequina e os isômeros de resveratrol, e apresentaram valores de %R fora da faixa recomendada ($70 < \%R < 120\%$). Portanto, a sensibilidade do procedimento poderia ser melhorada utilizando um detector de fluorescência.

As curvas analíticas elaboradas com a utilização do método, apresentaram linearidade na faixa de 0,5 a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com valores de coeficiente de determinação acima de 0,99, para a grande maioria dos compostos avaliados. Com base nos ensaios de exatidão do método, pode-se concluir que o extrato sólido-líquido (ESL) apresenta resultados mais satisfatórios para as três matrizes analisadas.

Portanto conclui-se que o método analítico mostrou-se adequado para a análise simultânea dos compostos fenólicos multiclases, podendo ser aplicado em diferentes matrizes. Além disso, o método validado apresenta um tempo de corrida curto para a separação dos compostos e com volume de solvente orgânico reduzido, pela utilização da fase móvel com baixos níveis de acetonitrila.

Os resultados obtidos indicam que os coprodutos agroindustriais bagaço e engaço de uva e bagaço de maçã se apresentam como fontes alternativas de compostos com atividades biológicas, em especial capacidade antioxidante significativa.

O engaço de uva foi o coproduto que apresentou a maior atividade antioxidante pelos métodos de sequestro dos radicais DPPH e ABTS e redução do ferro, além de elevado teor de compostos fenólicos totais.

O bagaço de maçã apresentou valores inferiores para o teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, quando comparado aos coprodutos da vinificação (bagaço e engaço de uva) porém, também pode ser considerado um coproduto que apresenta potencial antioxidante e que pode ser utilizado na recuperação dos recursos naturais antioxidantes sob a forma de polifenóis. Além

disso, o extrato do bagaço de maçã apresentou elevado potencial em proteger o óleo da oxidação lipídica, não apresentando diferença significativa quando comparado ao antioxidante sintético TBHQ.

Quanto à análise dos compostos fenólicos por CLAE-DAD, os coprodutos apresentaram principalmente compostos flavonoides, sendo a catequina e epicatequina de maior ocorrência e em níveis elevados, em especial no bagaço de uva.

A concentração inibitória mínima realizada com extratos dos coprodutos agroindustriais (BU, EU e BM) nas concentrações entre $72,0 \text{ mg mL}^{-1}$ a $1,87 \text{ mg mL}^{-1}$) não apresentaram inibição contra as bactérias testadas (*Staphylococcus aureus* e *Salmonella bongori*).

7 REFERÊNCIAS

ABE, L. T.; MOTA, R. V. da; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca L.* e *Vitis vinifera L.* **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, p. 394-400, abr.-jun. 2007.

ALBERTI, A., et al. Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. **Food Chemistry**, p. 151–158, 2014.

ALBERTI, A. **Compostos Fenólicos da Maçã: Extração, Perfil e Classes Fenólicas, Atividade Antioxidante, Processamento e Avaliação Termoanalítica.** Tese (Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev Inst Adolfo Lutz**, 66(1): 1-9, 2007.

AMENDOLA, D.; DE FAVERI, D.M.; SPIGNO, D.F. Grape marc phenolics: Extraction Kinetics, quality and stability of extracts. **Journal of Food Engineering**, v. 97, p. 384-392, 2010.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (AOCS), Method Cd12b-92. **In Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**, 5th ed; AOCS: Champaign, IL, USA, 2003.

ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, Vol. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.

AZMIR, J., ZAIDUL, I. S. M., RAHMAN, M. M., SHARIF, K. M., MOHAMED, A., SAHENA, F., JAHURUL, M. A., GHAFOR, K., NORULAINI, N. A. N., OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p.426 – 36, 2013.

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

BARCIA, M. T.; PERTUZATTI, P. B.; GÓMEZ-ALONSO, S.; GODOY, H. T.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Phenolic composition of grape and winemaking by-products of Brazilian hybrid cultivars BRS Violeta and BRS Lorena. **Food Chemistry**, n. 159, p. 95–105, 2014.

BARROS, A. et al. Evaluation of grape (*Vitis vinifera* L.) stems from Portuguese varieties as a resource of (poly)phenolic compounds: A comparative study. **Food Research International**, n. 65, p. 375–384, 2014.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/ACS, 2011

BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, jan./dez. 2003.

BUCIC-KOJIC, A.; PLANINIC, M.; TOMAS, S.; BILIC, M.; VELIC, D. Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. **Journal of Food Engineering**. Osijek, Croatia, p. 236–242, 2007.

BURIN, V. M.; FERREIRA-LIMA, N. E.; PANCERI, C. P., BORDIGNON-LUIZ, M. T. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of different extraction methods. **Microchemical Journal**, p. 155–163, 2014.

CABRAL, I. S. R. et al. Composição Fenólica, Atividade Antibacteriana e Antioxidante da Própolis Vermelha Brasileira. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 6, 1523-1527, 2009

CABRERA, L. C.; MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**. n. 4(3), p. 227-240, 2012.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS; M. L.; ZANELLA, R. Principais Técnicas De Preparo De Amostra Para A Determinação De Resíduos De Agrotóxicos Em Água Por Cromatografia Líquida Com Detecção Por Arranjo De Diodos E Por Espectrometria De Massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

CASTRO, C.; MURA, F.; VALENZUELA, G.; FIGUEROA, C.; SALINAS, R. M.; ZUÑIGA, C.; TORRES, J. L.; FUGUET, E.; DELPORTE, C. Identification of phenolic compounds by HPLC-ESI-MS/MS and antioxidant activity from Chilean propolis. **Food Research International**. N. 64, p. 873–879, 2014.

CATANEO, C.B.; CALIARI, V.; GONZAGA, L. V.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29,p. 93-102, jan./mar. 2008.

CHENA, H.; ZUOA, Y.; DENG, Y. Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 913, p. 387–395, 2001.

CHISTÉ, R.C.; MERCADANTE, A.Z.; GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J.L.F.C.; BRAGAGNOLO. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, London, v.127, p.419-426, 2011.

COELHO, L. M.; WOSIACKI, G. Avaliação sensorial de produtos panificados com adição de farinha de bagaço de maçã. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, p. 582-588, jul.-set. 2010.

COELHO, A. L. R. **Otimização Da Extração Sólido-líquido De Antioxidantes De Subprodutos Florestais Pelo Método De Superfície De Resposta**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química – Ramo de Tecnologias de Proteção Ambiental) – Instituto Superior de Engenharia do Porto, 2013.

CRESPO, J. G., BRAZINHA, C. Membrane processing: Natural antioxidants from winemaking by-products. **Filtration + Separation**, v.2, p.32 – 35, 2010.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades Antioxidantes de Compostos Fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, Jan.-Jun. 2004.

DIN SHIRAHIGUE, L.; PLATA-OVIEDO, M.; ALENCAR, S. M.; D'ARCE, M. A. B. R.; VIEIRA, T. M. F. S.; OLDONI, T. L. C.; CONTRERAS-CASTILLO, C. Wine industry residue as antioxidant in cooked chicken meat. **International Journal of Food Science and Technology**, n. 45, p. 863-870, 2010.

DIONÍSIO, A. G. G.; BATISTÃO, M. B.; SANTOS, V. B.; ICERI, T. M.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Novas Tendências em Preparo de Amostras para Cromatografia Líquida. **Scientia Chromatographica**, Vol.2, N°3, p. 19-29, 2010.

DOMÍNGUEZ-PERLES, R.; TEIXEIRA, A. I.; ROSA, E.; BARROS, A. I. Assessment of (poly)phenols in grape (*Vitis vinifera* L.) stems by using food/pharma industry compatible solvents and Response Surface Methodology. **Food Chemistry**, n. 164, p. 339–346, 2014.

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

DUTRA, F. L. G.; HOFFMANN-RIBANI, R.; RIBANI, M. Determinação de Compostos Fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Isocrática Durante Estacionamento da Erva-Mate. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 119-123, 2010.

FARHOOSH, R.; NIAZMAND, R.; REZAEI, M.; SARABI, M. Kinetic parameter determination of vegetable oil oxidation under Rancimat test conditions. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 110, n. 6, p. 587–592, 2008.

FONTANA, A. R.; BOTTINI, R. High-throughput method based on quick, easy, cheap, effective, rugged and safe followed by liquid chromatography-multi-wavelength detection for the quantification of multiclass polyphenols in wines. **Journal of Chromatography A**, 1342, p. 44–53, 2014.

FRANCISCO, M. L. D.; RESURRECCION, A. V. A. Development of a reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) procedure for the simultaneous determination of phenolic compounds in peanut skin extracts. **Food Chemistry**, Barking, v. 119, p. 356-363, 2009.

GÓMEZ-ALONSO, S.; GARCÍA-ROMERO, E.; HERMOSÍN-GUTIEÉRREZ, I. HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection

by DAD and fluorescence. **Journal of Food Composition and Analysis**, n. 20, p. 618–626, 2007.

GUERRERO, M S; SINEIRO, J T; NUÑEZ, M J. Extraction of polyphenols from white distilled grape pomace: Optimization and modeling. **Bioresource Technology**, p 1311–1318, Spain 2008.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon Press, p. 543, 1990.

HE, Y.; LU, Q.; LIVIU, G. Effects of extraction processes on the antioxidant activity of apple polyphenols. *CyTA – Journal of Food*, Vol. 13, n. 4, p. 603–606, 2015.

HE, W.; LIU, X.; XU, H.; GONG, Y.; YUAN, F.; GAO, Y. On-line HPLC-ABTS screening and HPLC-DAD-MS/MS identification of free radical scavengers in Gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) fruit extracts. **Food Chemistry**, Barking, v. 123, n. 2, p. 521–528, 2010.

HOLLER, F. James; SKOOG, A. Douglas; CROUCH, R. Stanley. **Princípios de Análise Instrumental**. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

HUBER, A. C. K.; KOHN, R. A. G.; NUNES, M. L.; RAMOS, W. P. Utilização de Resíduos das Vinícolas da Região da Campanha na Produção de Vermicomposto. **IX REUNIÃO SUL-BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO**. Lages - SC, 2012(a).

HUBER, K.; QUEIROZ, J. H.; MOREIRA, A. V. B.; RIBEIRO, S.M.R. Caracterização química do resíduo agroindustrial da manga ubá (*Mangifera Indica L.*): uma perspectiva para a obtenção de antioxidantes naturais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 06, n. 01: p. 640-654, 2012(b).

IACOPINI, P.; BALDI, M.; STORCHI, P.; SEBASTIANI L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. **Journal of Food Composition and Analysis** 21, p. 589– 598, 2008.

INFANTE, J.; SELANI, M.M.; TOLEDO, N.M.V.; SILVEIRA-DINIZ, M.F.; ALENCAR, S.M.; SPOTO, M.H.F. Atividade antioxidante de resíduos. **Alim. Nutr. Braz. J. Food Nutr.**, Araraquara, v. 24, n. 1, p. 87-91, 2013.

INFANTE, JULIANA. **Composição fenólica e atividade antioxidante de polpa, casca, semente e folha de espécies frutíferas nativas do Brasil**. 2013. 114 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2013.

KARACABEY, E.; MAZZA, G. Optimisation of Antioxidant Activity of Grape cane extracts using response surface methodology. **Food Chemistry** 119, p. 343–348, 2010.

KARAÇELİK, A. A.; KÜÇÜK, M.; ISKEFIYELI, Z.; AYDEMİR, S.; DE SMET, S.; MISEREZ, B.; SANDRA, P. Antioxidant components of *Viburnum opulus L.* determined by on-line HPLC–UV–ABTS radical scavenging and LC–UV–ESI-MS methods. **Food Chemistry**, n. 175, p. 106–114, 2015.

KOLEVA, I. I.; NIEDERLANDER, H. A. G.; VAN BEEK, T. A. An On-Line HPLC Method for Detection of Radical Scavenging Compounds in Complex Mixtures. **Analytical Chemistry**, v.72, p.2323-2328, 2000.

KOLEVA, I. I.; NIEDERLANDER, H. A. G.; VAN BEEK, T. A. Application of ABTS Radical Cation for Selective On-Line Detection of Radical Scavengers in HPLC Eluates. **Analytical Chemistry**, v.73, p. 3373-3381, 2001.

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

KUKIC, J.; POPOVIC, V.; PETROVIC, S.; MUCAJI, P.; CIRIC, A.; STOJKOVIC, D.; SOKOVIC, M. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. **Food Chemistry**, Barking, v. 107, p. 861-868, 2008.

LANÇAS, FERNANDO M. Como economizar (ou eliminar o uso de) acetonitrila em tempos de “crise”? **Scientia Chromatographica**. v. 1, n. 1, p. 51-60, 2009.

LEMOS, G. S.; SANTOS, J. S.; SANTOS, M. L. P. Validação De Método Para A Determinação De 5-Hidroximetilfurfural Em Mel Por Cromatografia Líquida E Sua Influência Na Qualidade Do Produto. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1682-1685, 2010.

LIMA, M. S. et al. Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil. **Food Chemistry**, n. 161, p. 94–103, 2014.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Potencial antioxidante de extratos de sementes de limão (*Citrus limon*). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, n. 30(2), p. 489-493, abr.-jun., 2010.

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

MAMEDE, M. E. de O.; PASTORE, G. M. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 22, n. 2, jul./dez. 2004.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Desempenho da vitivinicultura brasileira em 2015**. Mello, L. M. R. - Embrapa Uva e Vinho. 2016.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Uva**. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/uva>> acesso em 05 Jun 2015.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Maçã. **Informativo Nº 54**. Ano 6, vol. 54, março de 2013.

MASSARIOLI, A. P.; OLDONI, TATIANE L. C.; MORENO, I. A. M.; ROCHA, A. A.; ALENCAR, S. M. Antioxidant activity of different pitanga (*Eugenia uniflora* L.) fruit fractions. **Journal of Food, Agriculture & Environment**. Vol.11, p. 288-293, 2013.

MELLO, L. Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2012. **Comunicado Técnico, 137**. Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, 2013.

MELO, P. S.; et al. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.6, p.1088-1093, 2011.

MULERO, J.; PARDO, F.; ZAFRILLA, P. Antioxidant activity and phenolic composition of organic and conventional grapes and wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, n. 23, p. 569–574, 2010.

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

NATIVIDADE, M. M. P.; CORRÊA, L. C.; SOUZA, S. V. C.; PEREIRA, G. E.; LIMA, L. C. O. Simultaneous analysis of 25 phenolic compounds in grape juice for HPLC: Method validation and characterization of São Francisco Valley samples. **Microchemical Journal**, n. 110, p. 665–674, 2013.

OLDONI, T. L. C. **Prospecção e identificação de compostos bioativos de subprodutos agroindustriais**. 2010. 163f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo – Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Piracicaba, 2010.

OLDONI, T. L. C ; CABRAL, I. S. R. ; D'ARCE, M. A. B. R.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M.; NASCIMENTO, A. M.; ALENCAR, S. M. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v. 77, p. 208-213, 2011.

OLDONI, T.L C.; MELO, P.S.; MASSARIOLI, A.P.; MORENO, I.A.M.; BEZERRA, R.M.N.; ROSALEN, P.L.; SILVA, G.V.J.; NASCIMENTO, A.M.; ALENCAR, S.M. Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with Antioxidant activity from peanut (*Arachis hypogaea*) skin by combination of chromatography techniques. **Food Chemistry**, v. 192, p. 306-312, 2016.

OLIVEIRA, SANDRO DE. **Determinação da capacidade antirradicalar de produtos naturais isolando-se a quimiluminescência do luminol e ensaios fotométricos com radicais estáveis**. 2011. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo – Instituto de Química, São Paulo, 2011.

OLIVEIRA, DANIELA DA SILVA. **Nova metodologia para extração de compostos fenólicos de vinho tinto e avaliação da estabilidade dos extratos obtidos**. . Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2014.

PEKIC, B.; KOVAC, V.; ALONSO, E.; REVILLA, E.. Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds. **Food Chemistry**, n. 61(1/2), p. 201–206, 1998.

PERESTRELO, R. et al. Phenolic profile of Sercial and Tinta Negra Vitis vinifera L. grape skins by HPLC–DAD–ESI-MS - Novel phenolic compounds in Vitis vinifera L. grape. **Food Chemistry**, n. 135, p. 94–104, 2012.

PERUZZO, L. C. **Extração, Purificação, Identificação E Encapsulação De Compostos Bioativos Provenientes Do Resíduo Do Processamento Da Indústria Vinícola**. Tese (Programa de Pós-graduação em Engenharia Química) -

Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2014.

PORGALI, E.; BÜYÜKTUNCEL, E. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. **Food Research International**, n. 45, p. 145–154, 2012.

POTTER, H. **Abertura do mercado para a maçã chinesa ameaça produção em Santa Catarina**. Disponível em <<http://zh.clicrbs.com.br/rs/noticia/2016/01/abertura-do-mercado-para-a-maca-chinesa-ameaca-producao-em-santa-catarina-4944266.html#>> acesso em 05 Fev 2016.

PRESTA, M. A.; et al. Determination of Flavonoids and Resveratrol in Wine by Turbulent-Flow Chromatography-LC-MS. **Chromatographia Supplement.**, Vol. 69, 2009.

PRESTES, O. D. et al. Desenvolvimento e validação de um método analítico para a determinação de histamina em vinhos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. **Química Nova**, Vol. 30, n. 1, p. 18-21, 2007.

PRIOR, R.L; WU, X; SCHAICH, K. Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.10, p. 4290-4302 , 2005.

PROESTOS, C.; SERELI, D.; KOMAITI, M. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RPHPLC and GC-MS. **Food Chemistry**, 95, p. 44-52, 2006.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes Utilizados Em Óleos, Gorduras E Alimentos Gordurosos. **Química Nova**, Vol. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAMIREZ-LOPEZ, L. M.; MCGLYNN, W.; GOAD, C. L.; MIRELES, C. A. D. Simultaneous determination of phenolic compounds in Cynthiana grape (*Vitis aestivalis*) by high performance liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry. **Food Chemistry**. n. 149, p. 15–24, 2014.

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

REBELLO, L. P. G. et al. Phenolic composition of the berry parts of hybrid grape cultivar BRS Violeta (BRS Rubea x IAC 1398-21) using HPLC–DAD–ESI-MS/MS. **Food Research International**. n. 54, p. 354–366, 2013.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. e MELO, L.F.C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, Vol. 27, No. 5, 771-780, 2004.

RIBEIRO, E. T. S. **Emprego de técnicas de extração a alta e baixa pressão para obtenção de Polifenóis antioxidantes do subproduto agroindustrial de maçã**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

ROCKENBACH, I. **Compostos Fenólicos, Ácidos Graxos e Capacidade Antioxidante do Bagaço da Vinificação de Uvas Tintas (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.)**. Dissertação (Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

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

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

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

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Comunicado Técnico 125**. Embrapa - Fortaleza, CE, 2006.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado Técnico 127**. Embrapa - Fortaleza, CE, 2007(a).

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS•+. **Comunicado Técnico 128**. Embrapa - Fortaleza, CE, 2007(b).

SAGDIC, O. et al. RP-HPLC–DAD analysis of phenolic compounds in pomace extracts from five grape cultivars: Evaluation of their antioxidant, antiradical and antifungal activities in orange and apple juices. **Food Chemistry**, n. 126, p. 1749–1758, 2011.

SANT'ANNA, V. **Concentração de suco de uva por osmose direta e estudo tecnológico para o aproveitamento do bagaço**. Tese (Faculdade de Engenharia – Departamento de Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, 2013.

SATO, M. F.; VIEIRA, R. G.; ZARDO, D. M.; FALCÃO, L. D. NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Apple pomace from eleven cultivars: an approach to identify sources of bioactive compounds. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 29-35, 2010.

SAUTTER, C. K.; et al. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 25(3), p. 437-442, jul.-set., 2005.

SCOLA, G.; KAPPEL, V. D.; MOREIRA, J. C. F.; DAL-PIZZOL, F.; SALVADOR, M. Antioxidant and anti-inflammatory activities of winery wastes seeds of *Vitis labrusca*. **Ciência Rural**, v.41, n.7, jul, 2011.

SILVA, PATRÍCIA D. **Determinação de compostos fenólicos por HPLC**. 2012. 136 p. Dissertação (Mestrado em Química Industrial) - UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR, 2012.

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

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: World Congress On Computers In Agriculture, 7, Reno-NV-USA: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2009.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: World Congress On Computers In Agriculture, 4, Orlando-FL-USA: Anais. Orlando: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, p. 393-396, 2006.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4 ,n. 1, p. 71-78, 2002.

SILVA, F. A. S. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: International Conference On Computers In Agriculture, 6, Cancun, 1996. Anais. Cancun: **American Society of Agricultural Engineers**, p. 294-298,1996.

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

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. Bookman, Porto Alegre, 2002.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, 15(1), p.71-81, jan./abr., 2002.

SOARES, M; WELTER, L; GONZAGA, L; LIMA, A; MANCINI-FILHO, J; FETT, R. Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, p. 727-732, 2008 (a).

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de Uvas Niágara e Isabel. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 1, p. 059-064, 2008 (b).

SOARES, M. C.; RIBEIRO, E. T.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L. V.; LIMA, A.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Composition of phenolic acids content in apple (*Malus sp*) pomace. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 339-348, abr./jun., 2008 (c).

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

SOUSA, C. M. M.; et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, Vol. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; SILVA, M. J. M.; LIMA, A. Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 35, n. 3, p. 554-559, maio/jun., 2011.

SPIGNO, G.; DE FAVERI, D. M. Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. **Journal of Food Engineering**, n. 78, p. 793–801, 2007.

SPIGNO, G; TRAMELLI, L; DE FAVERI, D. M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, n. 81, p. 200–208, 2007.

STEPANIĆ, V; TROŠELJ, K.G; LUČIĆ, B; MARKOVIĆ, Z; AMIĆ, D. Bond dissociation free energy as general parameter for flavonoid radical scavenging activity. **Food Chemistry**, London, v.141, p.1562-1570, 2013.

TOALDO, I. M. et al. Bioactive potential of *Vitis labrusca* L. grape juices from the Southern Region of Brazil: Phenolic and elemental composition and effect on lipid peroxidation in healthy subjects. **Food Chemistry**, n. 173, p. 527–535, 2015.

TREMOCOLDI, MARIA AUGUSTA. **Caracterização, isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de abacates das cultivares Hass e Fuerte**. 2015. 112 p. Tese (Doutorado em Ciências) Centro de Energia Nuclear na Agricultura - Universidade São Paulo, Piracicaba, 2015.

VAN LEEUW, R.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J. O.; DOMMESB, J. Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from various grape varieties: Specificity of Pinot Noir. **Journal of Food Composition and Analysis**, n. 36, p. 40–50, 2014.

VEDANA, M. I. S.; ZIEMER, C.; MIGUEL, O. G.; PORTELLA, A. C.; CANDIDO, L. M. B. Efeito do processamento na atividade antioxidante de uva. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.19, n.2, p. 159-165, abr./jun. 2008.

VILLAÑO D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; TRONCOSO, A. M.; GARCÍA-PARRILLA, M. C. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. **Analytica Chimica Acta**, n. 538, p. 391–398, 2005.

ZARTH, N. A.; DONAZZOLO, J.; CITADIN, I.; PERONDI, M. A.; BRAIDA, J. A.; MAZARO, S. M. Caracterização Da Vitivinicultura Na Região Sudoeste Do Paraná. I **Seminário Sistemas de Produção Agropecuária** - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2007.

WIJNGAARD, H. H.; BRUNTON, N. The optimisation of solid–liquid extraction of antioxidants from apple pomace by response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, p. 134–140, 2010.

WRIGHT, J.S.; JOHNSON, E.R.; DILABIO, G.A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. **Journal American Chemical Society**, v.123, n.6, p.1173-1183, 2001.