

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA INDUSTRIAL

TATIANA MONARETTO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE, EXTRAÇÃO E
QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM SUCOS DE
UVA PRODUZIDOS NO SUDOESTE DO PARANÁ**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO

2013

TATIANA MONARETTO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE, EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO
DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM SUCOS DE UVA PRODUZIDOS NO
SUDOESTE DO PARANÁ**

Pré-projeto referente ao Trabalho de Conclusão de Curso como requisito parcial para a conclusão do Curso Bacharelado em Química – habilitação bacharelado da UTFPR – Campus Pato Branco.

Professor Orientador: Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni.

Coorientadora: Dra. Solange Teresinha Carpes.

Pato Branco, 2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado como: **Avaliação do potencial antioxidante, extração e quantificação de compostos fenólicos em sucos de uva produzidos no sudoeste do Paraná** foi considerado aprovado de acordo com a ata da banca examinadora 053B2.

Fizeram parte da banca os professores:

Orientadora: Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

Dra. Larissa Macedo dos Santos

Dr. Davi Silva

DEDICATÓRIA

A Aparício e Terezinha, pais amados, pela dedicação incondicional, pela confiança, e por acreditarem em meus sonhos.

Ao meu querido irmão Adriano pela compreensão em todos os momentos difíceis, pelas alegrias e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, que sempre me protege e me dá forças para lutar e superar todas as dificuldades.

Á Profa. Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni, por sua orientação, atenção, carinho e ensinamentos durante a realização deste trabalho.

Á Profa. Dra. Solange Terezinha Carpes, pelo fornecimento dos reagentes para a realização das análises.

Á minha amiga Mariéli Karling por seu companheirismo em todos os momentos.

Á todos os meus amigos e familiares que carinhosamente contribuíram para a realização desta graduação.

EPÍGRAFE

*“Viver é como andar de bicicleta: É
preciso estar em constante movimento
para manter o equilíbrio.”*

Albert Einstein

RESUMO

MONARETTO, Tatiana. 2013. Avaliação do potencial antioxidante, extração e quantificação de compostos fenólicos em sucos de uva produzidos no sudoeste do Paraná. 48f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharelado em Química Industrial) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco. 2013.

O suco de uva tem uma alta concentração de compostos fenólicos, que são responsáveis por diferentes atividades biológicas, entre elas a atividade antioxidante. Há na literatura estudos com sucos produzidos em diferentes regiões do país, no entanto, não existem resultados com sucos produzidos na região sudoeste do Paraná. Dentro deste contexto, este estudo teve como objetivo desenvolver um método analítico eficiente para identificar e quantificar os principais compostos fenólicos presentes no suco de uva produzido em Salgado Filho – PR, bem como determinar o potencial antioxidante destes sucos. Os sucos de uva analisados foram produzidos a partir da uva Bordô, variedade *Vitis labrusca* L., e pertenciam as safras de 2009, 2010 e 2012. A determinação dos compostos fenólicos foi realizada primeiramente pelo método de Folin-Ciocalteu e na sequência, foi desenvolvido método cromatográfico para identificar e quantificar os principais compostos fenólicos presentes nas amostras. A atividade antioxidante foi analisada por três métodos distintos, seqüestro do radical DPPH, captura do radical ABTS e método de redução do ferro (FRAP). O suco que apresentou a maior quantidade de compostos fenólicos ($2,6 \pm 0,7$ g EAG.L⁻¹) e maior atividade antioxidante, pelos três métodos, $10,2 \pm 0,5$ mmol.Trolox L⁻¹ para seqüestro do DPPH, $12,2 \pm 2,8$ mmol.Trolox.L⁻¹ para o ABTS e $7,5 \pm 1,9$ mmol Fe²⁺.L⁻¹ para FRAP, foi o pertencente a safra de 2012. Os compostos fenólicos identificados nas amostras foram os ácidos gálico, cafeico, cumárico, ferrúlico e o *t*-resveratrol.

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

ABSTRACT

MONARETTO, Tatiana. 2013. Evaluation of antioxidant potential, extraction and quantification of phenolic compounds in grape juice produced in southwestern Paraná. 48f. Course Conclusion of Work (Graduation in Bachelor of Industrial Chemistry). Federal Technological University of Paraná. Pato Branco. 2013

Grape juice has a high concentration of phenolic compounds, which are responsible for different biological activities, including antioxidant activity. There are studies in the literature with juices produced in different regions of the country, however, there are not results with juices produced in the southwest region of Paraná. Within this context, this study aimed to develop an efficient analytical method to identify and quantify the major phenolic compounds present in grape juice produced in Salgado Filho - PR, as well as determine the antioxidant potential these juices. The grape juices analyzed were produced from Bordeaux grape, *Vitis labrusca* L. variety, and belonged to the harvests of 2009, 2010 and 2012. The determination of phenol compounds was performed first by Folin-Ciocalteu and in sequence, chromatographic method was developed to identify and quantify the major phenolic compounds present in the samples. The antioxidant activity was analyzed by three different methods, sequestration DPPH, ABTS radical capture and iron reduction method (FRAP). The juice with the highest quantity of phenolic compounds (2.6 ± 0.7 g EAG L⁻¹) and higher antioxidant activity by the three methods, 10.2 ± 0.5 mmol Trolox L⁻¹ sequestration of DPPH, 12.2 ± 2.8 mmol⁻¹ Trolox.L for ABTS and 7.5 ± 1.9 mmol Fe²⁺ L⁻¹ FRAP was pertaining to the crop of 2012. Phenolic compounds identified in the samples were gallic acid, caffeic, coumaric, ferrúlico and *t*-resveratrol.

Keywords: grape juice, antioxidant activity, phenolic compounds, HPLC

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura genérica de uma molécula de flavonoide.....	18
Figura 2 – Estrutura dos principais flavonoides.....	19
Figura 3 – À esquerda, estrutura geral dos ácidos hidroxibenzoicos, e à direita, estrutura geral dos ácidos hidroxicinâmicos.....	20
Figura 4 – <i>Trans</i> – resveratrol.	21
Figura 5 – Estrutura química do radical DPPH e reação de estabilização com um antioxidante.....	23
Figura 6 – Redução do complexo TPTZ com Fe^{3+}	24
Figura 7- Formação do radical estável com persulfato de potássio e reação com antioxidante.....	25
Figura 8 – Extrator de suco de uva: a) recipiente com tampa para colocar a uva; b) recipiente do suco; c) depósito de água.....	33
Figura 9 - Cromatograma de uma amostra de suco de uva do ano de 2009. (a) 280 nm e (b) 320 nm, onde: 1 – ácido gálico; 2- ácido cafeico; 3 – ácido cumárico; 4 – ácido ferrúlico; 5 – <i>t</i> -resveratrol.	37
Figura 10 – Cromatograma de uma amostra de suco de uva do ano de 2010. (a) 280 nm e (b) 320 nm, onde: 1 – ácido gálico; 2- ácido cafeico; 3 – ácido cumárico.	38
Figura 11 - Cromatograma de uma amostra de suco de uva do ano de 2012. (a) 280 nm e (b) 320 nm, onde: 1 – ácido gálico; 2- ácido cafeico; 3 – ácido cumárico.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Radicais que formam as principais estruturas dos ácidos hidrobenzoicos.	20
Tabela 2 – Radicais que formam as principais estruturas dos ácidos hidrocínâmico.	20
Tabela 3 – Teor de compostos fenólicos totais nos sucos de uva.	34
Tabela 4 – Atividade antioxidante obtida para sucos de uva pelos métodos: DPPH, ABTS e FRAP.	35
Tabela 5 – Concentração dos fenólicos nas diferentes amostras analisadas.	40
Tabela 6 – Dados obtidos da linearidade dos padrões de fenólicos.	41
Tabela 7 – Dados obtidos no estudo da sensibilidade dos fenólicos.	42
Tabela 8 – Limite de detecção e quantificação do método para determinação e quantificação dos fenólicos.	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 Histórico da uva - Viticultura	15
3.1.1. Viticultura no estado do Paraná	16
3.2 UVA E SUCO DE UVA	17
3.3 Compostos fenólicos	17
3.3.1 Flavonoides	18
3.3.2 Ácidos fenólicos	19
3.3.2.1 Ácido hidroxibrenzóico e ácido hidroxicinâmicos	19
3.3.3 Grupo Estibeno - Resveratrol	21
3.4 Antioxidantes Naturais	22
3.4.1 Métodos para avaliar a ação antioxidante in vitro	23
3.4.1.1 – Atividade sequestrante do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).....	23
3.4.1.2 – Redução do ferro – FRAP (poder antioxidante de redução do ferro)	24
3.4.1.3 – Captura do radical livre ABTS•+	24
3.5 – parâmetros de otimização do método	26
3.5.1- Determinação da linearidade	26
3.5.2 Limites de detecção e limite de quantificação	26
3.5.3 Sensibilidade	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Coleta das amostras	28
4.2 Determinação de Compostos Fenólicos Totais	28
4.3 Determinação da Atividade Antioxidante	29
4.3.1 Atividade sequestrante do radical DPPH.....	29
4.3.2 – Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro – FRAP	29
4.3.3 – Captura do radical livre ABTS•+	30
4.4 determinação de Compostos Fenólicos por CLAE	30

4.4.1 Otimização do Método Cromatográfico	31
4.4.1.1 Determinação da linearidade	31
4.4.1.2 Limites de detecção e limite de quantificação	31
4.4.1.3 Sensibilidade	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 amostras	33
5.2 – Teor de compostos fenólicos totais	34
5.3 – Atividade antioxidante	35
5.4 Fenólicos por clae	36
5.4.1 Otimização do método cromatográfico	41
6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

O crescente interesse por produtos que contribuam para uma melhor qualidade de vida, provenientes de fontes naturais, tem impulsionado pesquisas voltadas para a busca de compostos bioativos, presentes em alimentos naturais e que apresentem substâncias benéficas à saúde. Dentre essas substâncias se destacam os compostos fenólicos, que possuem capacidade antioxidante, ou seja, habilidades de combater a oxidação resultante da ação dos radicais livres (MELO, 2010; SAUTTER et al., 2005).

Os compostos fenólicos estão presentes na maioria dos vegetais e frutas, além de atividade antioxidante e antimicrobiana, apresentam ainda propriedades anti-alergênicas, anti-aterogênicas, anti-inflamatórias, anti-trombóticas, bem como, efeitos cardioprotetivos e vasodilatadores (BENAVENTE-GARCIA et al., 1997; MIDDLETON et al., 2000; PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2001; MANACH et al., 2005; BALASUNDRAM et al., 2006, OLDONI, 2010).

Dentre as frutas, as uvas e principalmente os produtos de uva tinta são as maiores fontes de compostos fenólicos (MALACRIDA; MOTTA, 2005; BURIN et al., 2010). Devido às propriedades biológicas e nutricionais da uva, e o fato destas características estarem presentes em seus derivados, os sucos de uva têm conquistado o mercado brasileiro (PINTO et al., 2011).

Segundo Santana et al. (2008), as áreas de cultivo de videiras no Brasil atualmente atingem cerca de 60 mil hectares, sendo que, os Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco, Paraná, Santa Catarina e Bahia são os maiores produtores. Nos últimos anos tem ocorrido um aumento no consumo de suco de uva, e apesar de a exportação ter aumentado significativamente, o mercado interno tem absorvido grande parte da produção dos sucos de uva produzidos no Brasil.

Partindo do princípio que existem poucos estudos avaliando a composição fenólica de sucos de uva da região sudoeste do Paraná e baseando-se no exposto acima, este projeto tem como objetivo avaliar a atividade antioxidante dos sucos integrais produzidos na região sudoeste do Paraná bem como otimizar a metodologia analítica, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a ser utilizada para identificar e quantificar os principais ácidos fenólicos e o estilbeno *trans-resveratro*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a atividade antioxidante apresentada por sucos produzidos no sudoeste do estado do Paraná, bem como desenvolver e otimizar uma metodologia analítica, por CLAE, para identificação e quantificação dos principais compostos fenólicos presentes nestas amostras.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar sucos de uva integral de propriedades nas cidades de Salgado Filho safra de 2009, 2010 e 2012;
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais;
- Avaliar as propriedades antioxidantes utilizando três métodos distintos: sequestro do radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazina (DPPH), poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) e 2,2 – azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico) (ABTS);
- Otimizar uma metodologia analítica utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para a extração e determinação dos ácidos fenólicos: gálico, vanílico, cafeico, cumárico, ferulico e o estilbeno *trans*-resveratrol.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 HISTÓRICO DA UVA - VITICULTURA

Segundo relatos dos arqueólogos, as sementes de uvas mais antigas, já descobertas datam 7000 – 5000 anos a.c, estas foram encontradas na Geórgia (Rússia) (PRADO; SILVA, 2008).

As vinhas foram trazidas para as Américas por Cristóvão Colombo conforme descreve Martins (2004):

Da Europa, através das expedições colonizadoras, as vinhas chegaram a outros continentes, se aclimataram e passaram a fornecer bons vinhos, especialmente nas Américas do Norte (Estados Unidos) e do Sul (Argentina, Chile e Brasil) e na África (África do Sul). A uva foi trazida pra as Américas por Cristovão Colombo, na sua segunda viagem às Antilhas em 1493, e se espalhou, a seguir, para o México e sul dos Estados Unidos e às colônias espanholas da América do Sul. As videiras foram trazidas da Ilha da Madeira ao Brasil em 1543 por Martim Afonso de Souza e plantadas por Brás Cubas, inicialmente no litoral paulista e depois, em 1551, na região de Tatuapé (MARTINS, 2004, pg. 20).

A espécie cultivada primordialmente foi a *Vitis vinifera*, esta era procedente das regiões de Portugal e Espanha. Na primeira década do século XIX, ocorreu a decadência das plantações de uva, isso foi resultado da importação de videiras que apresentavam doenças fúngicas procedentes da América do Norte. Após esse fato, a uva Isabel passou a ser cultivada e mais tarde, no início do século XX, na região paulista a Isabel foi substituída pela Niágara e Seibel (PROTAS et al., 2008).

A viticultura tropical brasileira passou a ser realmente desenvolvida a partir de 1960, com o cultivo de vinhedos, na região do vale do Rio São Francisco no nordeste semi-árido brasileiro. Na década de 70 surgiu um pólo vitícola na região Norte do Paraná. E em 1980 ocorreu um desenvolvimento na produção de uvas destinadas para o consumo *in natura* nas regiões do Noroeste do Estado de São Paulo e Norte de Minas Gerais.

No Estado do Rio Grande do Sul, o elevado desenvolvimento na produção de uva foi consequência do apoio governamental. Na década de 70, houve um incentivo a produção de parreiras da espécie *Vitis vinifera*, este incentivo foi

decorrente das empresas multinacionais que se instalaram na região da Serra Gaucha e da Fronteira Oeste (PROTAS et al., 2008).

3.1.1. Viticultura no estado do Paraná

A viticultura no estado do Paraná teve início com a colonização e se desenvolveu no século XVI pelos espanhóis e jesuítas. Porém a fixação da cultura de videiras ocorreu somente em meadas do século XIX, com as variedades de uvas trazidas do estado de São Paulo e a chegada de descendentes de italianos vindos do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, os quais trouxeram consigo o hábito do cultivo de videiras. As principais espécies cultivadas foram a Isabel, a Bordô e a Francesa. Este cultivo visava apenas à produção de uvas para o consumo familiar, sendo poucas as iniciativas para a comercialização (BOTELHO; PIRES, 2012; ZARTH et al, 2007).

Na década de 90 ocorreu o incentivo de alguns a vitivinicultura, como forma de diversificar a renda do produtor rural, pois o cultivo de grãos, que sempre foi à matriz produtiva do sudoeste do Paraná, apresentava sinais de esgotamento. A principal estratégia para o desenvolvimento da vitivinicultura nesta região era incentivar os produtores a comercialização da uva *in natura* e dos seus derivados, vinhos e mais recentemente sucos (ZARTH et al, 2011).

Hoje o Paraná é um dos estados com maior produção de uva, sendo inferior somente ao estado do Rio Grande do Sul e São Paulo (BOTELHO; PIRES, 2012). Atualmente os municípios da região sudoeste do Paraná produzem uma grande quantidade de uva, da qual parte é destinada para o consumo familiar, porém, a maioria da produção é designada para a comercialização *in natura* ou para a produção de vinhos. Alguns municípios mais especializados também produzem outros derivados como suco, vinagre e licor (ZARTH et al., 2011).

Segundo Zarth et al. (2011), na micro-região de Francisco Beltrão, o município de Salgado Filho é o que apresenta a maior produção de uvas e vinhos, com 140 ha destinados ao cultivo de uva e a produção aproximada é de 1.530 toneladas. E da micro-região de Pato Branco, o município que se destaca é Mariópolis, o qual apresenta cerca de 60 ha designados ao cultivo de uva, num total de produção de 800 toneladas.

3.2 UVA E SUCO DE UVA

Segundo Sautter (2003) o suco de uva é definido como:

[...] o suco de uva é o líquido límpido ou turvo extraído da uva (*Vitis sp.*), através de processos tecnológicos adequados, não fermentado, de cor, aroma e sabor característicos, submetido a tratamento que assegure a sua apresentação e conservação até o momento do consumo. Portanto, as características de qualidade do suco dependem da cultivar utilizada na elaboração e do processo tecnológico empregado (SAUTTER, 2003, p. 20).

Os sucos de uva são ricos em compostos fenólicos, estes segundo estudos, apresentam ação anticarcinogênica, antiviral e antioxidante (MENESES, 2011). Porém, apesar do suco de uva conter grande quantidade de compostos fenólicos este não possui a mesma quantidade que a uva *in natura*, a quantidade destes compostos também pode variar dependendo da espécie, cultivar, maturidade, condições climáticas e os tratamentos que a uva é submetida no processo de produção do suco como o tempo de contato entre as partes sólidas da uva e o suco, o método utilizado para a extração, tratamento térmico, prensagem, a adição de ácidos ou dióxido de enxofre (PINTO et al., 2011).

Segundo a legislação brasileira, dependendo do tipo de processo e da constituição, o suco pode ser classificado: (1) *suco de uva integral*: apresenta composição natural, não sendo permitida a adição de outros açúcares; (2) *suco de uva concentrado*: parcialmente desidratado, tendo que apresentar no mínimo 65 °Brix de sólidos solúveis totais; (3) *suco de uva desidratado*: encontra-se na fase sólida e é resultado da desidratação do suco de uva, podendo apresentar somente 3% de umidade; (4) *suco de uva adoçado*: adição de açúcar ao suco de uva; (5) *suco de uva processado*: obtido através da diluição do suco concentrado ou desidratado (RIZZON et al., 1998).

3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

“Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, na forma simples ou de polímeros, o que lhes confere uma

estrutura antioxidante” (GALLICE, 2010). Além da atividade antioxidante, os compostos fenólicos apresentam uma gama de efeitos biológicos, dentre eles a atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e vasodilatadora (GALLICE, 2010).

Os compostos fenólicos podem ser classificados como flavonoides e não flavonoides. No grupo dos flavonoides estão os flavanóis (catequina, epicatequina), os flavonóis (caempferol, a quercetina, a rutina e a miricetina), antocianidina, flavonas e as flavanonas. Compondo o grupo dos não flavonoides estão os ácidos fenólicos, hidroxibenzóicos, hidroxicinâmicos e os estibenos. Entre os principais compostos pertencente à classe dos estibenos o resveratrol é um dos mais encontrados na uva (ABE et al., 2007). Os compostos fenólicos podem ser encontrados nos vegetais na forma complexa ligado a açúcares (glicosilados) e proteínas, ou na forma isolada (agliconas) (GALLICE, 2010).

Dentre as frutas, a uva é uma das que mais apresenta compostos fenólicos. “Os principais fenólicos presentes na uva são os flavonóides (antocianinas, flavanóis e flavonóis), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos) e uma larga variedade de taninos” (MALACRIDA; MOTTA, 2004, p.659).

3.3.1 Flavonoides

Os flavonoides são os compostos mais abundantes na dieta humana por serem encontrados em grande variedade de frutas, hortaliças, chá preto, vinho, suco de uva entre outros. Calcula-se que existem cerca de 5000 flavonóides com estruturas diferentes, mas que apresentam como estrutura básica o núcleo flavânico, Figura 1 (BEHLING et al., 2004; OLDONI, 2010).

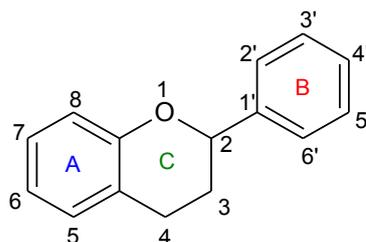


Figura 1 – Estrutura genérica de uma molécula de flavonoide.

Fonte: autoria própria.

As diferentes classes dos flavonóides estão relacionadas com as características do anel C como a presença ou ausência do anel central, hidroxilas ou duplas ligações ligadas a este (OLDONI, 2007). Na figura 2, os principais flavonóides encontrados na natureza, antocianidina, flavanóis, flavonóis, flavonas e as flavanonas.

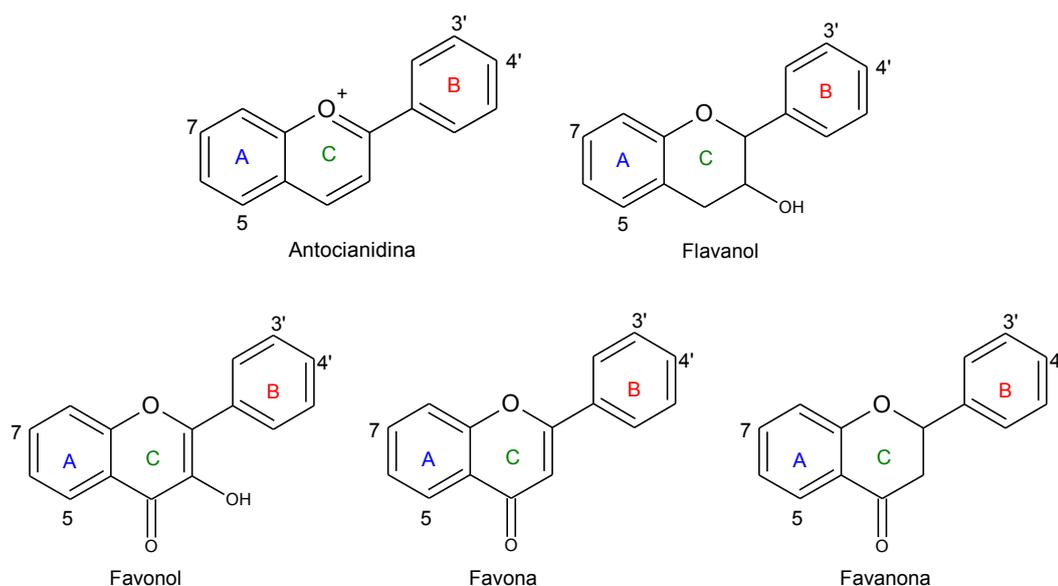


Figura 2 – Estrutura dos principais flavonoides.

Fonte: autoria própria.

3.3.2 Ácidos fenólicos

Ácido fenólico é designado para os fenóis que apresentam ácidos carboxílicos. Estes são divididos em dois grupos que apresentam estruturas diferentes os hidroxibenzóicos e os hidroxicinâmicos. Apesar das estruturas serem semelhantes, estas se diferenciam pelo número e posição da hidroxila no anel aromático (STALIKAS, 2007).

3.3.2.1 Ácido hidroxibenzóico e ácido hidroxicinâmicos

Os ácidos pertencentes ao grupo do ácido hidrobencóico e do ácido hidroxicinâmico tem origem nas estruturas gerais expostas na figura 3.

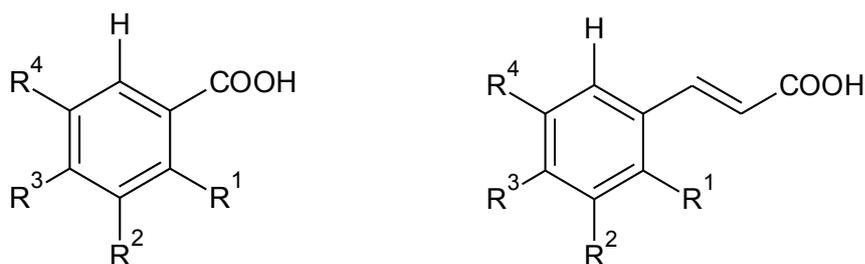


Figura 3 – À esquerda, estrutura geral dos ácidos hidroxibenzoicos, e à direita, estrutura geral dos ácidos hidroxicinâmicos

Fonte: Autoria própria.

Na tabela 1 são mostradas as estruturas básicas dos principais ácidos hidroxibenzoicos.

Tabela 1 – Radicais que formam as principais estruturas dos ácidos hidroxibenzoicos.

<i>Nome</i>	R^1	R^2	R^3	R^4
Ácido Benzoico	H	H	H	H
Ácido Vanílico	H	OCH ₃	OH	H
Ácido Gálico	H	OH	OH	OH
Ácido Siringico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Ácido Salicílico	OH	H	H	H

Fonte: SATALIKAS (2007), com algumas modificações.

Na tabela 2 estão expostas os radicais que formam as estruturas básicas dos principais ácidos pertencente ao grupo dos ácidos cinâmicos.

Tabela 2 – Radicais que formam as principais estruturas dos ácidos hidrocínâmico.

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

Fonte: SATALIKAS (2007), com algumas modificações.

3.3.3 Grupo Estibeno - Resveratrol

O surgimento de pesquisas sobre o resveratrol se originou devido á busca por soluções á um paradoxo Frances conforme descreve Abe (2007):

Os estudos com resveratrol tiveram início a partir de investigações relacionadas à dieta francesa, que apesar de rica em gorduras de origem animal, parece associada à baixa incidência de doenças cardiovasculares, fenômeno conhecido como “Paradoxo Francês” (ABE et al., 2007, p. 395).

O resveratrol é uma molécula natural que pode ser encontrada em amendoim, amora, cacau, algumas variedades de chá e outras 70 espécies de plantas, porém a principal fonte são as uvas e seus derivados (ACAUAN, 2007).

A molécula de resveratrol é sintetizada pela planta em resposta a agressões externas, como agressões físicas, ataques fúngicos, irradiação ultravioleta e substâncias químicas como ozônio e etileno (SAUTTER, 2003). Os sucos de uva produzidos com uvas orgânicas apresentam uma maior quantidade de resveratrol, uma vez que, quando defensivos agrícolas não são utilizados, a planta tem um maior desenvolvimento no metabolismo de autodefesa e conseqüentemente, uma maior produção de resveratrol (ACAUAN, 2007).

O resveratrol pode ser encontrado na forma *trans*-resveratrol e *cis*-resveratrol. “A forma *trans*-resveratrol é fotossensível, sendo transformada em *cis* na presença de luz visível” (SAUTTER, 2003, p.11). O *trans*-resveratrol é encontrado nas uvas, no entanto o *cis*-resveratrol somente é encontrado nos vinhos após o processo de vinificação (GALLICE 2010).

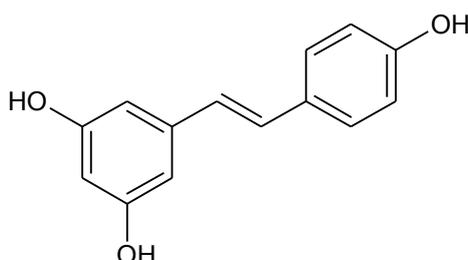


Figura 4 – *Trans* – resveratrol.
Fonte: Autoria própria.

3.4 ANTIOXIDANTES NATURAIS

Atualmente vem crescendo a procura por substâncias bioativas, principalmente os antioxidantes que apresentam a capacidade de reagirem com os radicais livres, mostrando assim, benefícios ao organismo (MELO, 2010).

A formação dos radicais livres ocorre naturalmente no metabolismo na realização de atividades físicas, pela exposição em excesso à luz solar e também pelo tabagismo. Esses radicais são moléculas instáveis que para se estabilizar precisam capturar elétrons de outras moléculas, o que causa danos biológicos devido à reação com moléculas de DNA, proteínas entre outros componentes da membrana celular. A principal patologia desencadeada por esses radicais são câncer e doenças cardiopatas (GALLICE, 2010; PINTO et al., 2011).

Os antioxidantes podem ser classificados como primários e secundários. Os primários fornecem aos radicais livres, elétrons ou hidrogênio ou ainda reagem com estes tornando-os moléculas estáveis. Já os antioxidantes secundários agem na complexação de metais, absorção da radiação ultravioleta, sequestro do oxigênio singlete, entre outros mecanismos que retardam a iniciação da autoxidação (PINTO et al., 2011).

Algumas pesquisas realizadas em sucos de uvas, para avaliar a atividade antioxidante dos compostos fenólicos afirmam que os sucos de uva apresentam atividade antioxidante similar a encontrada nos vinhos tintos. Estas ainda revelam que o suco de uva apresenta uma maior quantidade de compostos fenólicos glicosilados do que o vinho tinto, sendo estes absorvidos mais facilmente pelo organismo. No entanto, a presença de etanol no vinho “aumenta a absorção de fenólicos, pois previne a precipitação de polifenóis no trato digestivo” (MALACRIDA; MOTTA, 2004, p. 660). Uma das grandes vantagens que o suco de uva apresenta em relação ao vinho é a ausência de álcool, podendo ser consumido pela maioria das pessoas, incluindo crianças e pessoas portadoras de algumas doenças como, por exemplo, hepatite (MALACRIDA; MOTTA, 2004).

3.4.1 Métodos para avaliar a ação antioxidante *in vitro*

Existem várias técnicas que podem ser utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro* de um composto biologicamente ativo. Não há um método universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisamente e quantitativamente, devido a grande variedade de radicais livres e suas diferentes formas de atuação em organismos vivos. Assim, quanto mais métodos utilizados melhor, uma vez que cada técnica apresenta uma princípio que depende da matriz de reação, além disso, os compostos bioativos podem reagir de forma diferente dependendo do radical ou agente oxidante, utilizado no método. (ALVES et al., 2010; MELO, 2010). Abaixo segue os três métodos utilizados neste trabalho.

3.4.1.1 – Atividade sequestrante do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

O DPPH é uma molécula caracterizada como um radical livre estável por apresentar deslocalização do elétron desemparelhado em toda a sua molécula. Esta deslocalização confere ao DPPH uma coloração violeta que em solução de etanol apresenta uma banda de absorção máxima no comprimento de onda 517 nm. A atividade antioxidante é determinada por uma substância que sequestradora do radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina. O composto antioxidante age como doador de átomos de hidrogênio, quando este é adicionado á solução alcoólica de DPPH obtém-se a hidrazina e a coloração da solução é modificada de violeta para amarelo pálido, Figura 5 (ALVES et al., 2010; MELO, 2010).

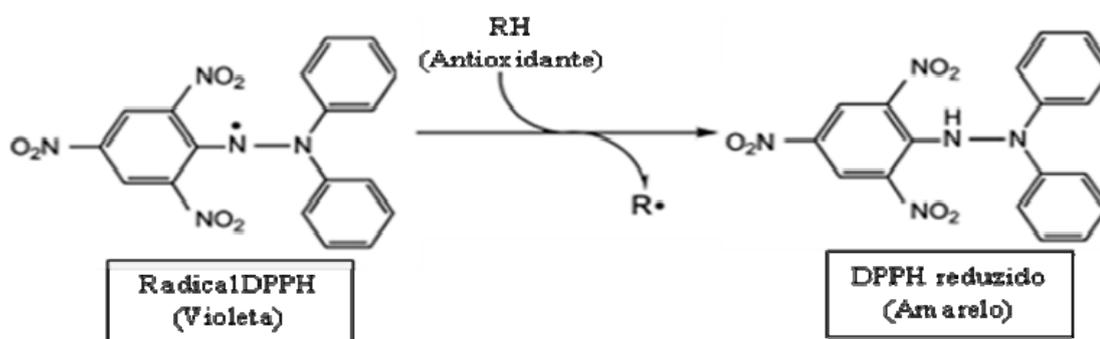


Figura 5 – Estrutura química do radical DPPH e reação de estabilização com um antioxidante.

Fonte: Moon e Shibamoto (2009).

3.4.1.2 – Redução do ferro – FRAP (poder antioxidante de redução do ferro)

Esse método avalia a atividade antioxidante por meio da redução do complexo ferritripiridiltriazina (Fe^{3+} - TPTZ) a ferroso tripiridiltriazina (Fe^{2+} TPTZ), em meio ácido, pelos agentes antioxidantes naturais presentes, neste caso no suco (Figura 6). Esta redução pode ser acompanhada pela coloração azul intensa apresentada pelo complexo de Fe^{2+} , com absorção na região de 593 nm.

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 Fe^{3+} a Fe^{2+} é antioxidante. Porém, este método é muito utilizado em conjunto com outros ensaios para análises de plantas e alimentos (OLDONI, 2010; PINELI,2009).

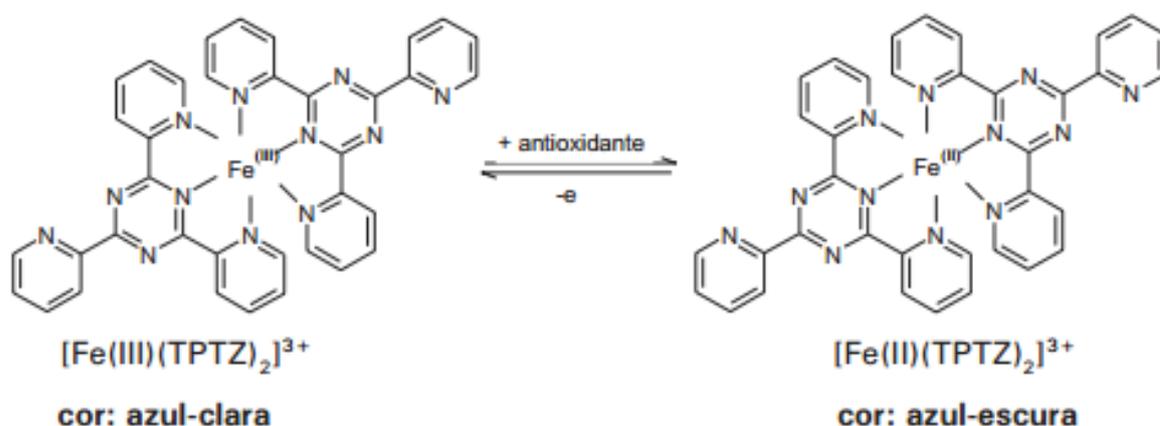


Figura 6 – Redução do complexo TPTZ com Fe^{3+} .

Fonte: Rufino et al. (2006).

3.4.1.3 – Captura do radical livre ABTS•+

Neste método há a necessidade de preparação do radical ABTS•+, seja por via química ou enzimática. Pelo método Re et al. (1999), o radical ABTS, de cor esverdeada, é formado por uma reação de redução do ABTS pelo persulfato. A atividade antioxidante é determinada pela descoloração do radical ABTS, que ao reagir com os antioxidantes presentes na amostra vai descolorindo, esse decaimento da coloração é medido pela absorbância em 734 nm (Figura 7). O poder

antioxidante dos compostos presentes na amostra são determinados comparando-se a absorbância da mistura ABTS amostra com a absorbância obtida da reação do radical ABTS com um antioxidante sintético padrão, neste caso Trolox, sendo o resultado expresso em TEAC.g⁻¹ (atividade antioxidante equivalente ao Trolox) (OLDONI, 2010; VEDANA, 2008).

Este método apresenta muitas vantagens, pois além de ser um método simples, pode ser usado em soluções com diferentes valores de pH e é solúvel em solventes aquosos e orgânicos, podendo assim ser utilizado para determinar a atividade antioxidante de fluidos corpóreos hidrofílicos e lipofílicos (VEDANA, 2008).

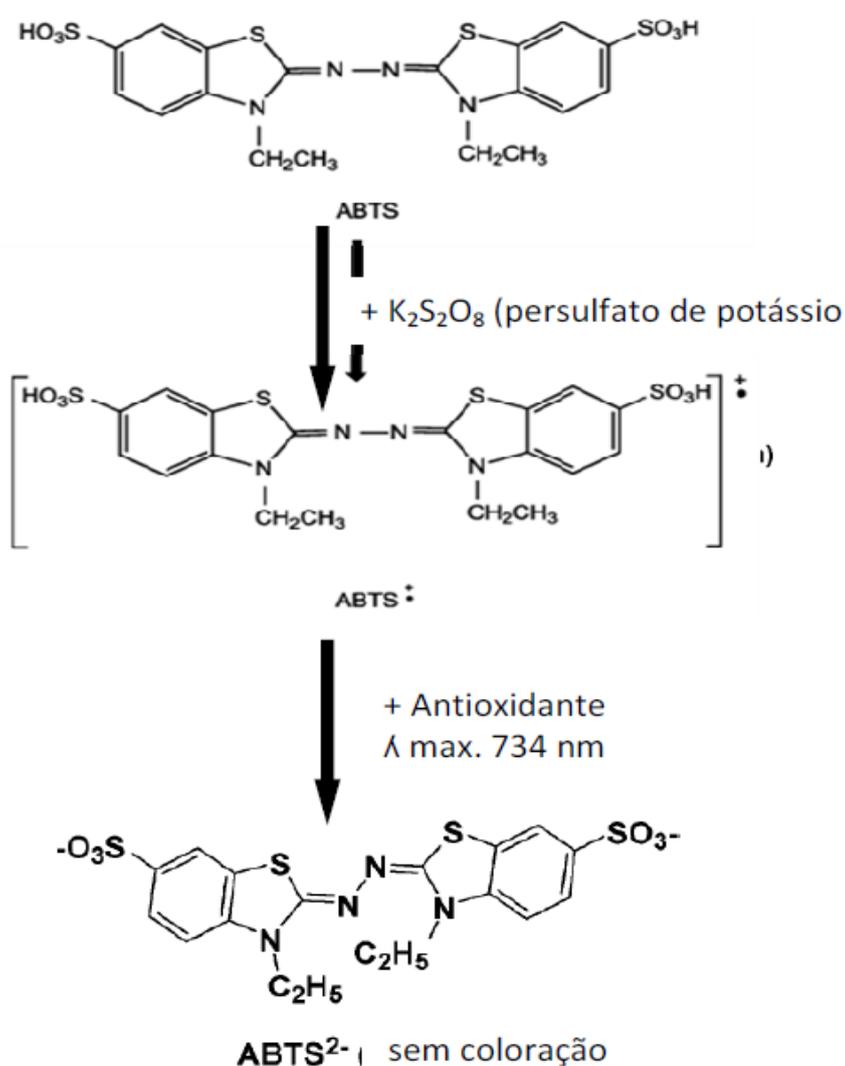


Figura 7- Formação do radical estável com persulfato de potássio e reação com antioxidante.

Fonte: Moon e Shibamoto (2009); Hung, Ou e Prior (2005).

3.5 – PARÂMETROS DE OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO

3.5.1- *Determinação da linearidade*

É a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (SILVA et al., 2006).

Um parâmetro que pode ser utilizado para avaliar a correlação da linearidade dos valores é o coeficiente de correlação, para este o valor 1, é o ideal, visto que, este indica uma correlação perfeita, conforme afirma Rieder (2000):

- r = 1, correlação perfeita;
- 0,91 < r < 0,99, correlação fortíssima;
- 0,61 < r < 0,90, correlação forte;
- 0,31 < r < 0,60, correlação média;
- 0,01 < r < 0,30, correlação fraca;
- r = zero, correlação nula.

3.5.2 *Limites de detecção e limite de quantificação*

O limite de detecção (LD) é a menor concentração da espécie em exame que pode ser detectada nas condições experimentais estabelecidas, porém não necessariamente quantificada. O LD pode ser avaliado de três formas diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros de curva analítica. O método selecionado para utilização neste trabalho será o sinal-ruído. (SILVA et al., 2006; RIBANI et al., 2004).

“O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental” (RIBANI et al., 2004, p. 778). Os mesmos métodos descritos para o LD também podem ser utilizados para LQ, que são: método visual, método sinal-ruído e método de parâmetro de curva analítica (RIBANI et al., 2004).

3.5.3 Sensibilidade

A sensibilidade demonstra a variação da resposta conforme ocorre alterações na concentração do analito, estando relacionada essencialmente com o método de detecção utilizado. Ela pode ser determinada pela inclinação da reta de regressão, sendo determinada simultaneamente na avaliação da linearidade (INMETRO, 2003; ARRUDA 2009).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras foram coletadas em uma propriedade na cidade de Salgado Filho e os sucos eram representativos dos anos de 2009, 2010 e 2012. Referente as safras de 2009 e 2010 foram coletados dois lotes distintos e para a safra de 2012 três lotes. Na propriedade, os sucos estavam armazenados em garrafas de vidro transparente e em ambiente escuro. Após a coleta, as garrafas foram armazenadas no escuro e abertas imediatamente antes das análises, sendo adotados alguns procedimentos para garantir a integridade das amostras, como a transferência do suco para garrafas pet, tomando-se o cuidado para eliminar o ar das garrafas, recobrimento destas com papel alumínio e armazenamento na geladeira. As análises, com exceção da CLAE, foram realizadas em triplicatas para cada lote.

4.2 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

O conteúdo de compostos fenólicos foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton et al. (1999). “O reagente Folin-Ciocalteu é uma solução complexa de íons poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul (MELO, 2010). As amostras foram diluídas e uma alíquota de 0,5 mL foi misturada com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído 1:10. Deixou-se a mistura de 3 a 8 minutos em repouso, na sequência, foram adicionados 2,0 mL de Na_2CO_3 4%. A absorbância foi medida a 740 nm depois de duas horas de incubação no escuro a temperatura ambiente. Os resultados foram expressos como teor de compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico (mg AG L^{-1}).

4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.3.1 Atividade sequestrante do radical DPPH

A metodologia utilizada para determinar a atividade sequestrante do radical DPPH está de acordo com proposto por Brand-Williams et al. (1995), com algumas modificações. A mistura de reação foi constituída pela adição de 0,5 mL dos padrões ou das amostras previamente diluídas. A este foi adicionado 3,0 mL de etanol 50% (v/v), 0,3 mL do radical DPPH, em solução de etanol ($0,5\text{mmol L}^{-1}$), incubou-se em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após 45 minutos de reação foi realizada leitura em espectrofotômetro a 517 nm. Para o controle negativo foi substituído o volume do extrato por igual volume do solvente utilizado na extração. Preparou-se o branco substituindo o volume da solução de DPPH por igual volume de etanol.

Foi preparada uma curva padrão com o antioxidante sintético Trolox em concentrações que variaram de 15 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Trolox, sendo na sequencia construído gráfico de calibração. Os resultados foram expressos em mmol de Trolox por litro da amostra. Com o auxilio desta curva determinou-se a capacidade antioxidante das amostras por este método.

4.3.2 – Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro – FRAP

Esta metodologia seguiu o descrito por Benziel e Strain (1996) com algumas modificações. O reagente FRAP foi preparado por meio da mistura de 25 mL de uma solução de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5 mL da solução TPTZ (10 mM TPTZ em 40 mM HCl) e 2,5 mL de FeCl_3 (20 mM) em solução aquosa. Adicionou-se uma alíquota de 100 μL da amostra previamente diluída a 3 mL do reagente FRAP e incubou-se a 37°C em banho-maria por 30 minutos. A absorbância foi medida após esse tempo é o espectrofotômetro zerado com a solução FRAP. Fez-se a curva de calibração com sulfato ferroso nas concentrações 100 – 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e os resultados foram expressos em mmol de Fe^{2+} por litro da amostra.

4.3.3 – Captura do radical livre ABTS•+

Para esta metodologia utilizou-se o descrito por Re et al., (1999) com algumas modificações. A formação do radical ABTS•+ foi obtida a partir da reação de 7 mM de ABTS com 140 mM de persulfato de potássio, incubada à temperatura ambiente na ausência de luz num período de 16 horas. Após esse tempo diluiu-se a solução em etanol até obter uma absorvância de $0,700 \pm 0,200$ em 734 nm. Foram adicionados 30µL de amostra para 3 mL da solução contendo o radical. A absorvância foi determinada em espectrofotômetro, a 734 nm após 6 minutos de reação. Para a construção da curva padrão utilizou-se o antioxidante sintético Trolox nas concentrações de 100 a 2000 µmol L⁻¹. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em mmol de Trolox por litro de amostra.

4.4 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CLAE

Os compostos fenólicos: ácido cafeíco, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido vanílico, ácido cumárico e o estilbeno *trans*-resveratrol foram extraídos da amostra utilizando a partição líquido-líquido e na sequência, identificados e quantificados por CLAE.

A extração líquido-líquido foi realizada de acordo com o descrito por Porgah e Büyüktuncel (2012), com algumas modificações. Acidificou-se 4 mL da amostra, a pH 2, com uma solução de ácido clorídrico 3 mol L⁻¹, na sequência adicionou-se 4 mL do solvente acetato de etila, este conjunto foi agitado no vórtex por 1 minuto e em seguida centrifugado por 5 minutos em 5000 rpm. O sobrenadante foi retirado e o processo de extração repetido três vezes. O sobrenadante resultante do processo foi evaporado em um evaporador rotativo e o resíduo seco dissolvido em 750µL de metanol e 250 µL de água.

Para análise por CLAE foi injetado um volume de 10 µL em um cromatógrafo líquido acoplado a um detector de fluorescência com λ_{em} 374 nm e λ_{ex} 330 nm para detecção do *trans*-resveratrol, sendo os demais compostos identificados pelo espectro de absorção na região ultravioleta, utilizando os recursos do detector de arranjo de fotodiodos. A coluna analítica utilizada foi de fase reversa C-18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) Varian, mantida a 30°C. A fase móvel utilizada foi uma mistura de

metanol (solvente B) e água (solvente A), ambos acidificados com ácido acético a 0,1%, com eluição em modo gradiente. O gradiente iniciou com 5% de B até 7% de B em 7 minutos, 20% de B em 15 minutos, 50% de B em 30 minutos, 90% de B em 50 minutos e 5% de B em 55 minutos, mantendo esta concentração por mais 10 minutos, numa vazão de 1 mL por minuto. Neste trabalho, foram utilizados padrões autênticos de ácido ferúlico, ácido gálico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido cumárico e *trans*-resveratrol.

4.4.1 Otimização do Método Cromatográfico

Todas as análises cromatográficas, incluindo a otimização do método foram realizadas ao abrigo da luz, a fim de evitar que o isômero *trans*-resveratrol fosse convertido em *cis*-resveratrol. Para a otimização do método cromatográfico foram avaliados os seguintes parâmetros:

4.4.1.1 Determinação da linearidade

Para a análise da linearidade do método foi determinada a área do pico para seis concentrações diferentes de seis padrões. O gráfico de calibração foi construído individualmente para cada composto plotando a área do pico (eixo y) versus a concentração (eixo x). Determinou-se análise de regressão linear com todos os dados obtidos e avaliou-se os resultados. O coeficiente de correlação também foi avaliado por meio do parâmetro coeficiente de correlação (r).

4.4.1.2 Limites de detecção e limite de quantificação

O LD foi determinado com a massa ou concentração do analito que gere um sinal três vezes maior que o do ruído, $3N$, em que N é a amplitude do ruído medido empregando-se um branco em vez do sinal do equipamento.

$$LD = 3 N \quad (1)$$

O LQ foi definido com a massa do analito que gera um sinal de 10N, onde o N é o desvio padrão do ruído.

$$LQ = 10 N \quad (2)$$

4.4.1.3 Sensibilidade

Este parâmetro foi determinado pela inclinação da reta de regressão, sendo determinado simultaneamente na avaliação da linearidade

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AMOSTRAS

Para a produção dos sucos foi utilizada a uva bordô, sendo atualmente observada uma crescente procura por esta espécie para a fabricação de sucos e vinhos, pois além desta apresentar alta resistência a doenças fúngicas, também tem elevado teor de antocianinas, permitindo aumentar a coloração dos sucos e vinhos, acidez baixa e teor de açúcar que varia de 14 a 17 ° Brix (RIZZON et al., 1998).

Os sucos coletados foram produzidos com o auxílio de um equipamento designado de “extrator de suco”. Este equipamento é composto por três partes distintas: (a) recipiente com orifícios e tampa, onde é colocada a uva; (b) recipiente maior com abertura cônica no centro para passagem do vapor e abertura lateral para engarrafamento do suco; (c) depósito de água gerador de vapor, responsável pela extração do mosto (Figura 8) (RIZZON et al., 1998). Os sucos foram envasados ainda quentes e para garantir a conservação do produto foi realizado procedimento de pasteurização, não havendo assim o acréscimo de aditivos químicos.



Figura 8 – Extrator de suco de uva: a) recipiente com tampa para colocar a uva; b) recipiente do suco; c) depósito de água.

Fonte: Rizzon et al., 1998.

5.2 – TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Os resultados obtidos para o teor de compostos fenólicos totais nas amostras analisadas foram próximos, não apresentando diferença significativa si (Tabela 3).

Tabela 3 – Teor de compostos fenólicos totais nos sucos de uva.

<i>Amostras de sucos</i>	<i>Fenólicos Totais (g EAG L⁻¹)*</i>
Salgado Filho 2012	2,6 ± 0,7 a
Salgado Filho 2010	1,7 ± 0,2 a
Salgado Filho 2009	2,3 ± 0,3 a

*Valores representam as médias ± desvio padrão n = 3
Médias das colunas seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey p<0,05).

Em estudo realizado por Gurak et al. (2008), amostras de suco de uva integral apresentaram teores de fenólicos que variavam do 1,07 e 2,62 g EAG L⁻¹. Sautter et al. (2005) analisaram sucos de uva adquiridos no comércio de Santa Maria e obtiveram teor de fenólicos totais para o suco integral de 1,62 e 2,21 g EAG L⁻¹, enquanto para o reprocessado os teores variaram entre 1,55 e 1,61 g EAG L⁻¹. Gollucke et al. (2009), analisaram sucos de uva da região do Rio Grande do Sul e os resultados obtidos variaram de 2,87 e 2,59 g EAG L⁻¹ para a variedade Concord e 1,76 e 1,43 g EAG L⁻¹ para a variedade Isabel.

Burin et al. (2010) em análise de sucos de uva bordô, do estado de Santa Catarina, encontraram valores de 0,24 e 2,14 g EAG L⁻¹ para sucos caseiros, 1,12 e 3,43 g EAG L⁻¹ para os comerciais e 2,63 e 2,64 g EAG L⁻¹ para sucos orgânicos. Gurak et al. (2010), em estudos de compostos fenólicos em amostras de sucos de uva produzidas pela EMBRAPA, encontraram valores médios de 2,096 g EAG L⁻¹. Analisando os dados descritos acima, é possível concluir que os resultados para compostos fenólicos totais obtidos neste trabalho corroboram com os encontrados na literatura.

5.3 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para a determinação da atividade antioxidante, três métodos distintos, com princípios diferentes foram utilizados para caracterizar a atividade biológica das amostras (Tabela 4). Os resultados obtidos para as três safras analisadas não diferiram estatisticamente entre si.

Tabela 4 – Atividade antioxidante obtida para sucos de uva pelos métodos: DPPH, ABTS e FRAP.

Amostras de sucos	Métodos para determinação da Atividade antioxidante		
	DPPH (mmol de Trolox L ⁻¹)*	ABTS (mmol de Trolox L ⁻¹)*	FRAP (mmol de Fe ²⁺ L ⁻¹)*
Salgado Filho 2012	10,2 ± 0,5 a	12,2 ± 2,8 a	7,5 ± 1,9 a
Salgado Filho 2010	8,1 ± 0,5 a	8,2 ± 1,9 a	5,8 ± 0,1 a
Salgado Filho 2009	9,4 ± 0,7 a	7,7 ± 0,8 a	6,1 ± 0,6 a

Valores representam as médias ± desvio padrão n = 3

Médias das colunas seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey p<0,05).

Burin et al. (2010), analisaram a atividade antioxidante, pelo método DPPH, em sucos de uva produzidos no estado de Santa Catarina, para os sucos comerciais foram encontrados resultados que variaram de 2,51 e 11,05 mmol L⁻¹ TEAC; para os orgânicos 8,24 e 9,08 mmol L⁻¹ TEAC e para os caseiros 7,32 e 8,23 mmol L⁻¹ TEAC. Os sucos eram provenientes de uvas da espécie borô (*Vitis labrusca*) e foram produzidos a partir da safra de 2007. Gollucke et al. (2009), encontraram valores de 7,45 e 9,68 mmol L⁻¹ TEAC para sucos produzidos a partir da variedade Concord e 7,40 e 6,33 mmol L⁻¹ TEAC para aqueles produzidos a partir da variedade Isabel. As uvas foram produzidas no estado Rio Grande do Sul e foram colhidas no ano de 2006.

Novamente, os resultados obtidos no presente estudo corroboram com aqueles obtidos na literatura e indicam elevada atividade antioxidante para as amostras estudadas. Poucos estudos são encontrados na literatura descrevendo a atividade antioxidante quando se utiliza o método de seqüestro do radical ABTS e redução do Fe²⁺. Desta forma, os resultados obtidos foram comparados com extratos produzidos a partir do bagaço e polpa da uva. Vale ressaltar a importância do presente estudo, já que irá contribuir com uma melhor caracterização da atividade biológica dos sucos produzidos no estado do Paraná.

5.4 FENÓLICOS POR CLAE

Os fenólicos presentes nas amostras foram identificadas de acordo com o tempo de retenção, similaridade espectral e cocromatografia. Para a detecção dos compostos que apresentam absorção na região do ultravioleta-visível, foi utilizado o comprimento de onda 280 nm para os ácidos gálico e o vanílico e 320 nm para os compostos ácidos cafeico, cumárico, ferrúlico. Para a identificação do *trans*-resveratrol foi utilizado detector de fluorescência.

Para o suco de uva da safra de 2009 foram detectados e quantificados os seguintes compostos: ácido gálico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferrulico e o *trans*-resveratrol (Figura 9 e Tabela 5). Nas amostras produzidas nos anos de 2010 e 2012 não foram detectados o ácido ferrulico e o *trans*-resveratrol (Figura 10 e 11 e Tabela 5).

Algumas amostras apresentaram desvio padrão elevado (Tabela 5), isto pode ser justificado pelo fato de as uvas não serem todas produzidas em uma mesma propriedade, ou seja, o produtor dos sucos compra uvas de propriedades vizinhas para a fabricação do suco, desta forma, pode ser observado variação na composição química das amostras.

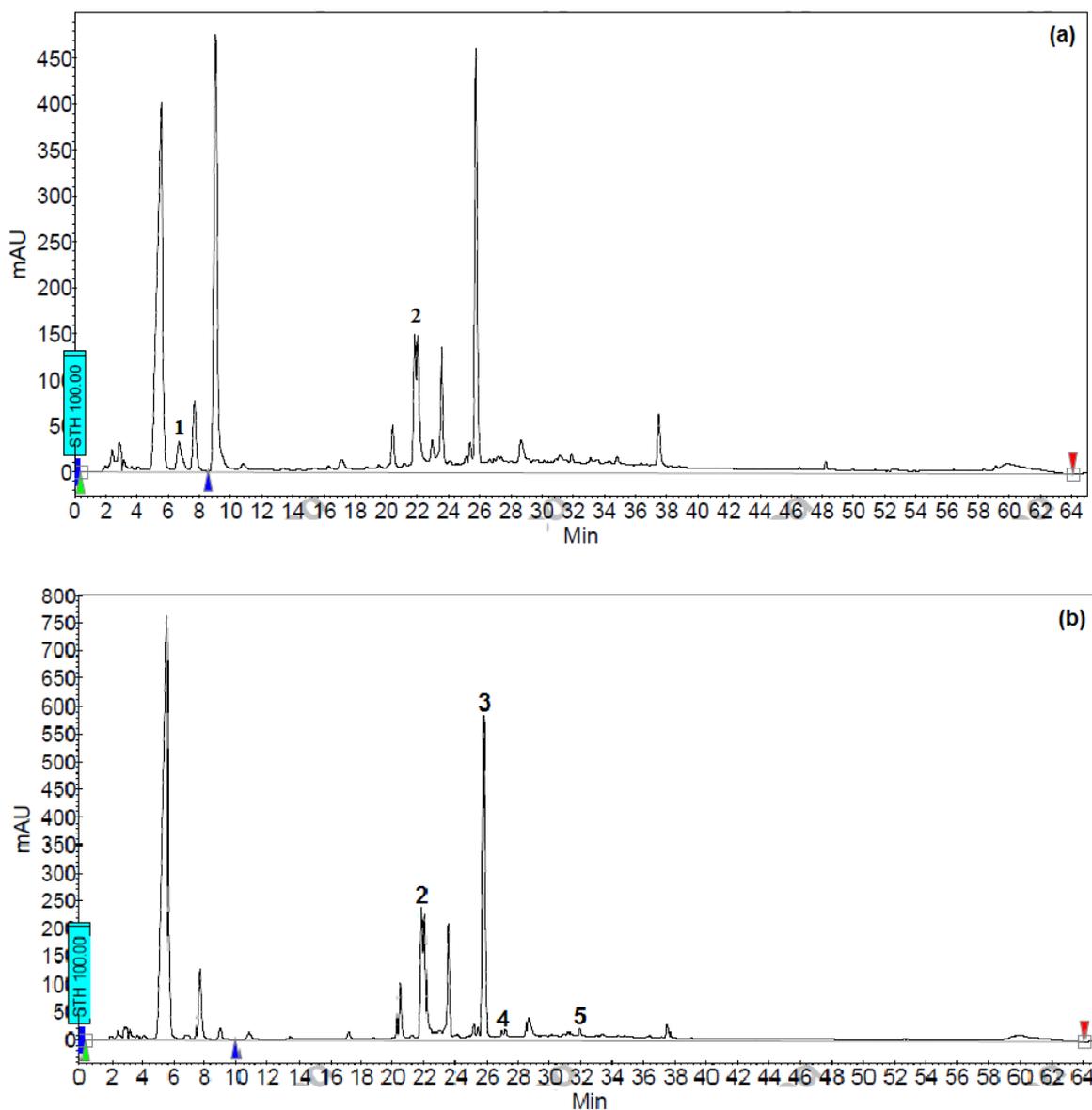


Figura 9 - Cromatograma de uma amostra de suco de uva do ano de 2009. (a) 280 nm e (b) 320 nm, onde: 1 – ácido gálico; 2- ácido cafeico; 3 – ácido cumárico; 4 – ácido ferrúlico; 5 – *t*-resveratrol.

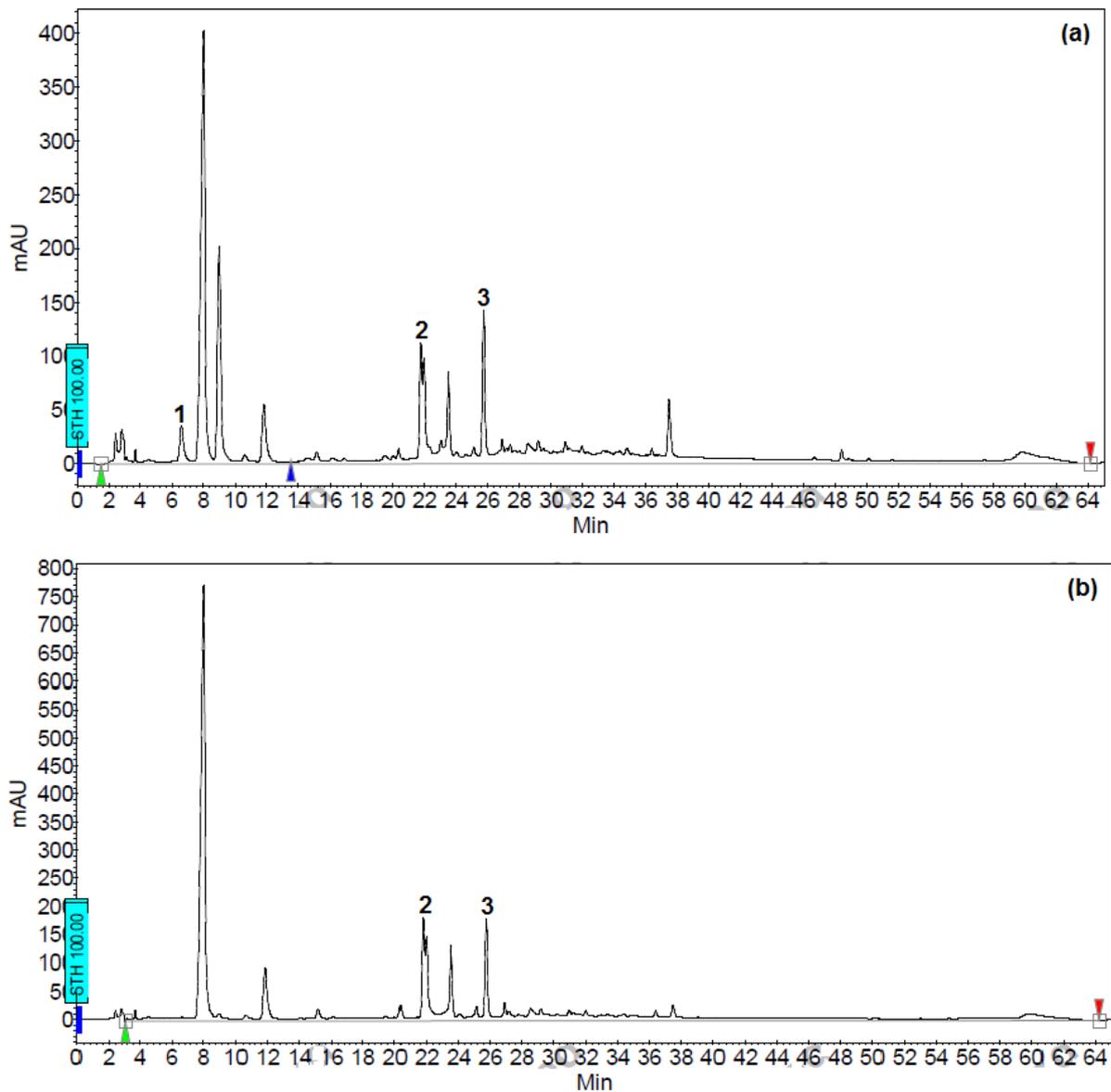


Figura 10 – Cromatograma de uma amostra de suco de uva do ano de 2010. (a) 280 nm e (b) 320 nm, onde: 1 – ácido gálico; 2- ácido cafeico; 3 – ácido cumárico.

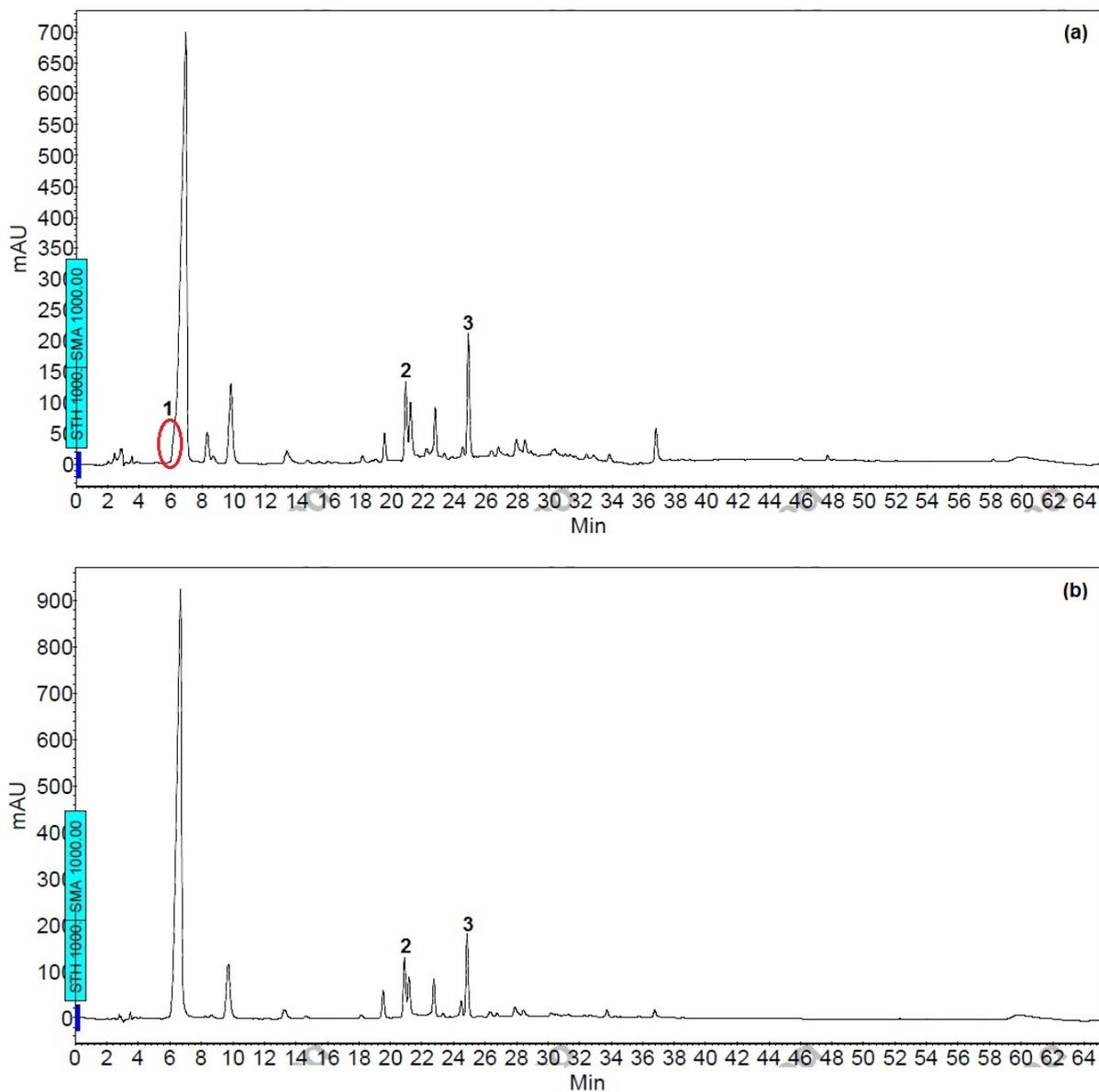


Figura 11 - Cromatograma de uma amostra de suco de uva do ano de 2012. (a) 280 nm e (b) 320 nm, onde: 1 – ácido gálico; 2- ácido cafeico; 3 – ácido cumárico.

Tabela 5 – Concentração dos fenólicos nas diferentes amostras analisadas.

Amostras Fenólicos	Salgado Filho 2009	Salgado Filho 2010	Salgado Filho 2012
Ácido Gálico (mg L⁻¹)	44,9 ± 4,1	32,7 ± 1,3	5,9 ± 1,0
Ácido Vanílico (mg L⁻¹)	ND	ND	ND
Ácido Caféico (mg L⁻¹)	75,3 ± 2,8	42,2 ± 16,2	43,8 ± 3,4
Ácido Cumárico (mg L⁻¹)	100,8 ± 43,5	41,5 ± 0,3	49,1 ± 12,4
Ácido Ferrúlico (mg L⁻¹)	2,9 ± 0,1	ND	ND
Resveratrol (mg L⁻¹)	11,4 ± 0,1	ND	ND

* ND: não detectado.

Novamente foram encontrados poucos trabalhos em literatura especializada com a identificação e quantificação dos compostos fenólicos analisados.

Rodrigues et al. (2012) analisaram sucos de uvas tintas da variedade *Vitis labrusca*, bordô, pertencente ao ano de 2009. O suco convencional foi obtido na vinícola Perini Ltda. na cidade de Farroupilha – RS, e o suco orgânico na Aecia Cooperativa de Agricultores Ecologistas em Antonio Prado – RS. Estes analisaram alguns compostos fenólicos por CLAE, encontrando para o suco orgânico 5,3 ± 0,01 mg L⁻¹ para a ácido gálico e 0,224 ± 0,41 mg L⁻¹ para o *trans*-resveratrol. Para o suco convencional foi encontrado 8,27 ± 0,01 mg L⁻¹ para o ácido gálico e 0,145 ± 0,01 mg L⁻¹ para o *trans*-resveratrol.

Fracasseti et al. (2011), em análise de 12 amostras de sucos de uva branca, provenientes do sul africano, sendo que 9 destas eram da variedade Sauvignon Blanc, um da Semillon e dois sucos da Chenin Blanc, todos pertencem ao ano de 2010, encontraram valores entre 0,41 a 3,7 mg L⁻¹ de ácido cafeico para a variedade Sauvignon Blanc, 0,50 e 0,82 mg L⁻¹ para a variedade Semillon e 0,51 mg L⁻¹ para a Chenin Blanc.

Sautter et al.(2005), em uma quantificação do *trans*-resveratrol por CLAE, em sucos de uva produzido no Brasil, encontrou valores de 0,41mg L⁻¹ para o suco de uva integral e 0,75 mg L⁻¹ para o suco reprocessado. Badalotti (2011) em amostras análise de sucos de uva provenientes de uma empresa da cidade de Garibaldi encontrou 0,75 mg L⁻¹ de resveratrol para a uva da qualidade bordô, 0,44 mg L⁻¹ para a concord e 1,8 mg L⁻¹ para a Isabel.

5.4.1 Otimização do método cromatográfico

Linearidade

Foi avaliada a linearidade para cada padrão. Os coeficientes de correlação (r) demonstram uma correlação fortíssima segundo Rieder et al. (2000) (Tabela 6).

Tabela 6 – Dados obtidos da linearidade dos padrões de fenólicos.

Ácido gálico		Ácido vanílico		Ácido cafeico	
[] inj. (mg L ⁻¹)	Sinal U. Área	[] inj. (mg L ⁻¹)	Sinal U. Área	[] inj. (mg L ⁻¹)	Sinal U. Área
5	1,5	5	1,3	5	2,6
10	2,6	10	2,5	7	3,7
15	4,8	15	4	15	8,3
80	25,7	30	9,2	60	37,6
150	45,6	40	13	120	61,4
200	61,2	50	16,12	150	76,6
Inclinação da reta: 0,306 Intersecção da reta: 0,102 R ² : 0,999		Inclinação da reta: 0,337 Intersecção da reta: -0,758 R ² : 0,998		Inclinação da reta: 0,509 Intersecção da reta: 1,397 R ² : 0,992	
Ácido cumárico		Ácido ferrúlico		Resveratrol	
[] inj. (mg L ⁻¹)	Sinal U. Área	[] inj. (mg L ⁻¹)	Sinal U. Área	[] inj. (mg L ⁻¹)	Sinal U. Área
5	4,1	3	2,5	3	3,2
10	8,4	5	3,9	5	5,3
15	13,5	10	8,1	7	6,1
100	70,5	15	11,3	60	17,7
150	101,7	50	39,2	120	37,2
200	139,3	60	46,1	150	46,4
Inclinação da reta: 0,681 Intersecção da reta: 1,743 R ² : 0,999		Inclinação da reta: 0,772 Intersecção da reta: 0,144 R ² : 0,999		Inclinação da reta: 0,772 Intersecção da reta: 0,144 R ² : 0,999	

Pela análise dos coeficientes de correlação, pode-se dizer que o método apresentou-se linear bem como a faixa de concentração do analito coincidiu com a faixa dinâmica linear do equipamento.

Sensibilidade

Por meio do estudo da linearidade do método foi obtida a sensibilidade, que é a inclinação da curva de calibração (Tabela 7).

Tabela 7 – Dados obtidos no estudo da sensibilidade dos fenólicos.

Fenólicos	Sensibilidade
Ácido gálico	0,306
Ácido vanílico	0,337
Ácido cafeico	0,509
Ácido cumarico	0,681
Ácido ferrulico	0,772
<i>t</i> – resveratrol	0,772

A curva padrão que apresentou a maior sensibilidade foi aquela obtida para os compostos ácido ferúlico e trans-resveratrol.

Limite de detecção e quantificação

Estes parâmetros foram determinados utilizando-se a relação sinal-ruído no tempo de retenção em que o composto de interesse é eluído. (Tabela 8).

Tabela 8 – Limite de detecção e quantificação do método para determinação e quantificação dos fenólicos.

Fenólicos	Limite de Detecção (mAU)	Limite de Quantificação (mAU)
Ácido Gálico	0,84	2,80
Ácido Vanílico	1,44	4,80
Ácido Cafeíco	2,94	9,8
Ácido Cumárico	0,33	1,09
Ácido Ferrúlico	1,63	5,42
Resveratrol	0,65	2,16

Todos os compostos analisados ficaram dentro dos limites de detecção e quantificação calculados.

6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos para os sucos analisados é possível concluir que estes apresentam uma elevada atividade antioxidante, assim como, elevado teor de compostos fenólicos, podendo ser considerados fontes de compostos com atividade biológica. Não foi observada diferença estatisticamente significativa para as atividades testadas nos diferentes anos de produção, o que comprova que nos anos em que estas safras foram colhidas, pouca variabilidade de composição química foi obtida nos produtos finais. Verificou-se pequena variação no teor de compostos fenólicos analisados por CLAE, no entanto, esta variação não foi suficiente para influenciar na atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS

- ARRUDA, Vanilda A. S. de. **Estabilidade de vitaminas do complexo B em pólen apícola**. 2009. 120f. Dissertação de mestrado (Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.
- ABE, Lucile T.; DA MOTA, Vieira; LAJOLO, Franco M.; GENOVESE, Maria, I. Compostos fenólicos e a capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimento**, Campinas, v. 27, n.2, p. 394-400, abril – junho/2007.
- ACAUAN, Ana P. Supermolécula pode prevenir doenças. **Revista da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**, Rio Grande do Sul, n. 133, p. 6 – 9, março – abril/2007.
- ALVES, Clayton Q.; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P.; BAHIA, Marcus V. AGUIAR, Rosane M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n.10, p. 2202-2210, 2010.
- BADALOTTI, Daiane A. **Compostos fenólicos e atividade antioxidante de sucos de uva bordô, concord e isabel elaborados com uvas produzidas pelo sistema orgânico**. 2011. 53f. Trabalho de conclusão de curso (Tecnólogo em Viticultura e Enologia) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul. Bento Gonsalves, 2011.
- BALASUNDRAM N.; SUNDRAM K.; SAMMAN S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, Barking, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.
- BENZIE, I. F.F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 239, p. 70-76, 1996.
- BEHLING, Estela B.; SENDÃO, Milena C.; FRANCESCATO, Heloisa D. C.; ANTUNES, Lusânia M. G.; BIANCHI, Maria de L. P. Flavonóides quercetinas: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos Nutricionais**. Araraquara, v. 5, n. 3, p. 285 – 292, 2004.
- BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARTIN, F.R.; ORTUNO, A.; DEL RIO, J.A. Uses and properties of citrus flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, p. 4505-4515, 1997.
- BOTELHO, Renato V.; PIRES, Erasmo J. P. **Perfil sócio-econômico da vitivinicultura na região sudoeste do Paraná**. Disponível em: <http://www.uepg.br/uepg_departamentos/defito/htm/labiovegetal/Viticultura.pdf> Acesso em 19 de maio de 2012.
- BRAND-WILLIAN, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – food Science and Technology**. London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BURIN, Maria V.; FALCÃO, Lila D.; GONZAGA, Luciano V.; FETT, Roseane; ROSIER, Jean P.; BORDGNON-LUIZ, Terezinha. Colour, phenolic content and antioxidant activity of grape juice. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 30, n. 4, p. 1027- 1032, out./dez., 2010.

EMMON, Cheryld .L. ; PETERSON, David. M.; PAUL, Gregory. L. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. *In vitro* antioxidant activity and content of phenolic and tocol antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, p. 4894-4898, nov., 1999.

FRACASSETTI, D; LAWRENCE, N; TREDoux, A G. J.; TIRELLI, A; NIEUWOUDT, H H.; DU TOIT, W J. Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method. **Food Chemistry**, Barking, v. 128, p. 1136-1142, 2011.

GALLICE, Wellington C. **Caracterização do potencial antioxidante e vinhos e quantificação de fenóis totais e trans-resveratrol utilizando técnicas cromatográficas e espectroscópicas multivariadas**. 2010. 87f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

GULLUCKE, Andréia P. B.; CATHARINO, Rodrigo R.; SOUZA, Jane C.; EBERLIN, Marcos N.; TAVARES, Débora Q. Evolution of major phenolic components and radical scavenging activity of grape juices through concentration process and storage. **Food Chemistry**, Barking, v. 112, p. 868-873, 2009.

GURAK, Poliana D.; CABRAL, Lourdes M. C.; ROCHA-LEÃO, Maria H. M.; MATTA, Virgínia M.; FREITAS, Suely P. Quality evaluation of grape juice concentrated by reverse osmosis. **Journal of Food Engineering**, London, v. 96, p. 421-426, 2010.

GURAK, Poliana D.; SILVA, Márcia C.; MATTA, Virgínia M. da; LEÃO-ROCHA, Maria H.; CABRAL, Lourdes M. C. Avaliação de parâmetros físico-químico de sucos de uva integral, néctares de uva e néctares de uva light. **Revista de Ciências Exatas**, Seropédica, v. 27, n. 1, 2008.

HUANG, Dejian; OU, Boxin; PRIOR, Ronald. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Revisão 01, INMETRO, 2003, 36p. (DOQ-CGCRE-008). Disponível em:
<http://www.farmacia.ufmg.br/lato/downloads/validacao_inmetro.pdf> Acesso em 28 de março de 2013.

MALACRIDA, Cassia R.; MOTTA, Silvana da. Comopostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n. 4, p. 659-664, outubro – dezembro/2005.

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

MARTINS, Marcelo C. **Análise de vinhos por RMN**. 2004. 37f. Relatório de estágio supervisionado. (Graduação em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.
MENESES, Flávia; MESSIAS, Gisele M.; BARROS, Natalia E. R. Análise sensorial de suco de uva orgânico – teste de aceitação. **Revista Eletrônica: Novo Enfoque**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 12, p. 01– 05. 2011.

MELLO, Loiva M. R. **Viticultura brasileira** – Panorama 2009. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2009. Artigo Técnico. Disponível em:
<<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/prodvit2009vf.pdf>> Acesso em: 02 de abril de 2012.

MELO, Priscilla S. **Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais**. 2010. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Piracicaba, 2010.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 52, p. 673-751, 2000.

MOON, Joon-Kwan; SHIBAMOTO, Takayuki. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 1655–1666, 2009.

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

OLDONI, Tatiane 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.

PINELI, Lívia de L. de O. **Qualidade e potencial antioxidante *in vitro* de morangos *in natura* e submetidos a processamentos**. 2009. 222f. Tese (Doutorado em Ciência da Saúde) – Universidade de Brasília. Brasília, 2009.

PINHEIRO, Erika S. **Avaliação dos aspectos sensoriais, físico-químicos e minerais do suco de uva da variedade benitaka (*Vitis vinifera* L.)**. 2008. 106f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimento) – Universidade Federal do Ceará – Centro de Ciências Agrárias. Fortaleza, 2008.

PINTO, Ellen P.; MOREIRA, Angelita da S.; MACHADO, Mirian R. G.; RODRIGUES, Rosane da S. A uva como um alimento funcional. **Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**, Bento Gonsalves, v. 3, p. 66 – 73, set. 2011.

PORGAH, Esra; BÜYÜKTUNCEL, Ebru. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. **Food Research International**, Essex, v. 45, p. 145 – 154, 2012.

PRADO, Anderse; SILVA, Tiago M. **Mundo vino**. 2007. 83f. Monografia (Graduação em Jornalismo) – Faculdade de Ciências Sociais e Aplicadas da Universidade de Tuiuti do Paraná, Curitiba, 2008.

PROTAS, José F. da S.; CAMARGO, Umberto A.; MELO, Loiva M. R. **A viticultura Brasileira: perspectivas e realidades**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008. Disponível em:
<<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/viticultura/>> Acesso em 02 de abril de 2012.

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

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.

RIEDER, Arno; DORES, Eliana F. G. de C.; HIGA, Nilton; MORAES, Miguel P. L. de. Alterações no teor de matéria orgânica de solos e provável efeito no poder de proteção ambiental nas bordas do pantanal diante da poluição por pesticidas. **Pesticidas**, Curitiba, v. 10, p. 87-112, 2000.

RIBANI, Marcelo; BETTOLI, Carla B. G.; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C. S. F.; MELO, Lucio F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v.27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIZZON, Luiz A.; MANFROI, Vitor; MENEGUZZO, Júlio. Elaboração de suco de uva na propriedade vitícola. **Embrapa: Uva e Vinho**. Bento Gonsalves, documento 21,1998, 24p.

ROCKENBACH, Ismael I.; RODRIGUES, Eliseu; GONZAGA, Luciano V.; CALIARI, Vinícius; GENOVESE, Maria I. GONÇALVES, Any E. de S. S.; FETT, Roseane. 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**, Barking, n. 127, p. 174,179, Jan. 2011.

RODRIGUES, Adriana D.; SCHEFFEL, Thamiris B.; SCOLA, Gustavo; SANTOS, Maite T. dos; FRNK, Bruna; FREITAS, Suzana C. V. de; DANI, Caroline; VANDERLINDE, Regina; HENRIQUES, João A. P. COITINHO, Adriana, S.; SALVADOR, Mirian. Neuroprotective and anticonvulsant effects of organic and conventional purple grape juices on seizures in Wistar rats induced by pentylenetetrazole. **Neurochemistry International**, v. 60, p. 799-805, jan. 2012.

RUFINO, Maria S. M.; ALVES, Ricardo E.; BRITO, Edy S.; MORAIS, Selene M.; SAMPAIO, Caroline G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara; SAURA-CALIXTO, Fulgencio D. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. 4 p. (Comunicado Técnico, 125).

SANTANA, Merce T. A.; SIQUEIRA, Heloisa H. de; REIS, Kelen C. dos; LIMA, Luiz C. de O. SILVA, Richardson J. L. Caracterização de diferentes marcas de sucos de uvas comercializados em duas regiões do Brasil. **Ciência Agrotécnicas**. Lavras, v. 32, n. 3, p. 882-886, maio/junho, 2008.

SAUTTER, Cláudia K. **Avaliação da presença de resveratrol em suco de uva**. 2003. 135f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

SAUTTER, Cláudia K.; DENARDIN, Sandra O.; ALVES, Audrei O.; MALLMANN, Carlos A.; PENNA, Neidi G.; HECKTHEUER, Luisa H. Determinação de resveratrol em suco de uva no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimento**, Campinas, v. 25, n.3, p. 437-442, jul./set., 2005.

SILVA, Andréia de P.; ALVES, Míriam C. C. Como iniciar a validação de métodos analíticos. In: ENQUALAB – 2006, CONGRESSO E FEIRA DA QUALIDADE EM METROLOGIA. Rede Metrológica do Estado de São Paulo – REMESP, São Paulo, junho de 2006, p. 8 – 14.

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

SOUSA, Cleyton M. de M.; SILVA, Hilris R.; VIEIRA JUNIOR, Gerardo M.; AYRES, Mariane C. C.; COSTA, Charlyton L. da; ARAÚJO, Delton S.; CAVALCANTE, Luis C. D.; BARROS, Elcio D. S.; ARAÚJO, Paulo B. de M.; BRANDÃO, Marcela S.; CHAVES, Mariana H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v.30, n. 2, p. 351-355, 2007.

STALIKAS, Constantine D. Extraction, separation e detection methods for phenolic acid and flavonoids. **Journal of Separation Science**. v. 30, n. 18, p. 3268 - 3295, december, 2007.

VEDANA, Maria I. S. **Efeito do processamento na atividade antioxidante na uva**. 2008. 85f. Dissertação (Mestrado em tecnologia de alimentos) – Universidade Federal do Paraná – Setor de Tecnologia. Curitiba, 2008.

ZARTH, Nelson A.; DONAZZOLO, Joel; CITADIN, Idemir; PERONDI, Miguel A.; BRAIDA, João A.; MAZARO, Sérgio M. Caracterização da vitivinicultura na região sudoeste do Paraná. In: I SEMINÁRIO SISTEMA DE PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA, 2007, Dois Vizinhos. **Anais do I Seminário: Sistemas de Produção** Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2007. p. 129-133.

ZARTH, Nelson. A.; CITAIN, Idemir.; PERONDI, Miguel. A.; DONAZZOLO, Joel. Perfil Sócio-econômico da vitivinicultura na região sudoeste do Paraná. **Synergismus cyentifica**. Pato Branco, v. 6, n. 1, 2011.