



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS



AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM GELEIA DE UVA PRODUZIDA
COM A VARIEDADE IAC -138-22 (MÁXIMO)

Luciula Lemos Lima Morelli

Engenheira de Alimentos

Prof. Doutor Marcelo Alexandre Prado

Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para obtenção do título de
Mestre em Ciência de Alimentos

Campinas, SP- 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M815a Morelli, Luciula Lemos Lima
Avaliação de compostos fenólicos em geleia de uva produzida com a variedade IAC-138-22 (máximo) / Luciula Lemos Lima Morelli . -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Marcelo Alexandre Prado
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Compostos fenólicos . 2. Capacidade antioxidante. 3. Geleia.
4. Cromatografia líquida. 5. Planejamento experimental I. Prado,
Marcelo Alexandre. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Engenharia de Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Evaluation of phenolic compounds in grape jam produced with the variety IAC 138-22

Palavras-chave em inglês (Keywords): Phenolic compounds, Antioxidant capacity, Grape, Liquid chromatography, Experimental design

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Marcelo Alexandre Prado

Myrna Sabino

Severino Matias de Alencar

Mario Roberto Marófica Junior

Raquel Grando de Oliveira

Data de Defesa: 28/01/2011

Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação Avaliação De Compostos Fenólicos Em Geleia De Uva Produzida Com A Variedade IAC -138-22 (Máximo), defendida em 28/01/2011 por Luciula Lemos Lima Morelli, aprovada pela comissão julgadora em 28/01/2011.

Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado

Prof. Dra. Myrna Sabino

Prof. Dr. Severino Matias Alencar

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior

Dra. Raquel Grando de Oliveira

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Marcelo Alexandre Prado, pela disponibilidade em me atender e me ensinar durante todo o período. Com ele aprendi a “tirar leite de pedra” e a utilizar todos os recursos com criatividade.

Agradeço à professora Helena Teixeira Godoy e à professora Juliana Azevedo Lima Pallone pelos auxílios técnicos e pela amizade, fatores essenciais no sucesso desta dissertação.

Agradeço aos professores da FEA pelas disciplinas dadas, as quais me auxiliaram muito em meu desenvolvimento técnico

Agradeço aos meus amigos do laboratório, que sempre me deram força para continuar, mesmo nos dias mais problemáticos, sempre tentando auxiliar, hora com o trabalho, hora com o conhecimento técnico maior que o meu. Certamente a minha tese tem um pouco de cada um deles, o que me deixa muito orgulhosa.

Agradeço aos técnicos Cristina Boccato Ferreira e Dirceu Pedro Alves pela ajuda de suma importância durante todo o período de mestrado. Com eles pude economizar boas horas do meu trabalho.

Agradeço à minha família, em especial ao meu marido, José Everaldo Morelli, pela compreensão em momentos que precisei estar ausente para que o meu trabalho fosse feito com sucesso e, principalmente, por me encorajar a seguir meus sonhos.

RESUMO GERAL

O presente trabalho buscou avaliar a presença de compostos fenólicos antioxidantes em geleia de uva produzida com a variedade Máximo (IAC-138-22), por meio de (1) métodos colorimétricos e (2) cromatografia líquida de alta eficiência. Foram produzidas 3 formulações de geleia com a nova variedade e 3 outras com a mistura entre as variedades Niágara Rosada e Isabel, para efeito comparativo. As formulações diferiam em relação à quantidade de casca de uva incorporada à formulação, sendo a primeira tradicional, ou seja, sem adição de cascas, a segunda com incorporação de 3% em massa de casca e a terceira com 6% das mesmas. Foi avaliada a capacidade antioxidante do produto por meio do teste com o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-pictrazil), teste com o sistema beta caroteno/ácido linoléico e teste com o método FRAP (Ferric Ability Reducing of Plasma) sendo os resultados expressos em relação à concentração equivalente de ácido gálico. Os principais compostos fenólicos antioxidantes foram identificados e quantificados nas formulações de geleia de uva por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Os compostos identificados foram ácido gálico, (+) – catequina, (-) – epicatequina e rutina. Os métodos se mostraram eficientes para a análise de compostos fenólicos. Das amostras analisadas, a geleia que apresentou maior capacidade antioxidante e quantidade de compostos fenólicos identificados por cromatografia líquida de alta eficiência foi a que continha 6% em massa de casca de uva em sua formulação.

Palavras-chave: Geleia de Uva; Compostos Fenólicos; Capacidade Antioxidante; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ABSTRACT

The purpose of this work was to evaluate the presence of antioxidant phenolic compounds present in Grape Jam produced with the variety Maximo (IAC-138-22), through (1) colorimetric methods and (2) high performance liquid chromatography. Three different jam formulations were produced with the variety IAC 138-22 and other three were produced with the blend most commonly used in Brazil, the mixture of the varieties Niagara Rosada and Isabel, in order to compare the performance between the products. The formulations differed by the amount of grape skin added to the recipe, since the first formulation was the traditional one, without the addition of the dried skins. At the second it was added 3% in mass of dried grape skins and at the third 6% of the same ingredient. The colorimetric methods analyzed the antioxidant capacity of the products by the free radical DPPH(1,1-difenil-2-pictrazil), by the beta carotene/linoleic acid system and also the FRAP (Ferric Ability Reducing of Plasma) method, being the results expressed in galic acid equivalent concentration. Some antioxidant phenolic compounds were quantified by high performance liquid chromatography. The galic acid and the flavonoids (+) –catechin, (-) – epicatechin and rutin were the major compounds identified among others. The methods were shown to be efficient to analyze the antioxidant phenolic compounds. Among the samples analyzed, the Jam which contained 6% in mass of grape skin in its formulation was the one that presented the higher antioxidant capacity and the major amount of antioxidant phenolic compounds identified by high performance liquid chromatography.

Keywords: Grape Jam; Phenolic Compounds; Antioxidant Capacity; High Performance Liquid Chromatography

INTRODUÇÃO GERAL

A produção de uvas no Brasil tem apresentado uma tendência crescente. Em 2007 foram produzidas $1,4 \times 10^7$ toneladas de uvas, 11% superior ao ano de 2006. Do total de uvas produzidas, 47,02% foram destinados à elaboração de vinhos, sucos e outros derivados (MELLO, 2007).

As condições climáticas favoráveis para a produção de uvas no Rio Grande do Sul, principal pólo de produção de vinhos, foram as principais razões deste aumento em 2007. A quantidade total de uvas para processamento aumentou em 35%, em relação ao ano anterior, enquanto as uvas destinadas ao consumo *in natura* apresentaram decréscimo (MELLO, 2007), evidenciando a relevância da pesquisa voltada para produtos processados e seus resíduos.

Uma alternativa viável para o aproveitamento econômico das frutas *in natura* é o processamento, por exemplo, na forma de geleias, que agrega valor ao produto e, quando comparada ao vinho, pode ser consumida por maior parcela da população, tais como crianças e portadores de doenças (LAGO, GOMES e SILVA, 2006; MALACRIDA e MOTTA, 2005; ROMERO-PÉREZ et al., 1999; ALBUQUERQUE, NACCO e FARO, 1996). Esse produto também pode ter função de melhoria nas condições de geração de renda dos pequenos produtores de uva, por meio de desenvolvimento de novas

formulações, com variedades diferentes, acrescentando apelos de alimentos funcionais, visto que há vários compostos benéficos à saúde nas uvas.

A uva, juntamente com seus derivados, constitui importante fonte de compostos fenólicos, que podem ser classificados entre flavonóides e não flavonóides (estilbenos e ácidos fenólicos). Do primeiro grupo fazem parte os flavanóis (catequina, epicatequina e epigallocatequina), flavonóis (kaempferol, quercetina e miricetina) e antocianinas, e ao segundo grupo pertencem os estilbenos (por exemplo, o resveratrol), os derivados de ácido cinâmico e benzóico e uma larga variedade de taninos (ABE et al., 2007; FRANCIS, 2000). Os compostos fenólicos da uva têm recebido bastante atenção devido ao seu potencial antioxidante. Nos últimos anos, o crescimento no interesse em antioxidantes naturais e seu papel na saúde e nutrição humanas tem sido notório. Antioxidantes são definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, são capazes de inibir ou retardar substancialmente a oxidação desse substrato. Os antioxidantes não se tornam radicais livres pela doação de elétrons, visto que eles são estáveis em ambas as formas. As propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos podem ocorrer por meio da doação de hidrogênio ou elétrons aos radicais livres, podendo, assim, apresentar potenciais benéficos em relação à prevenção de enfermidades cardiovasculares, circulatórias, cancerígenas e neurológicas (IACOPINI et al., 2008; KATSUBE et al., 2003; WANG e MAZZA, 2002; ISHIGE, SCHUBERT e SAGARA, 2001; LAPIDOT et al., 1999; SCHRAMM e YGERMAN, 1998; RICE-EVANS, MILLER e PAGANDA, 1997; TSUDA et al., 1994).

O mecanismo de atuação dos compostos antioxidantes presentes em matrizes alimentícias pode ser medido, dentre outras maneiras, por meio de ensaios colorimétricos *in vitro*, os quais medem a habilidade desses compostos em doar hidrogênios ou elétrons aos radicais livres, estabilizando-os e também impedindo ou retardando a etapa de propagação desses radicais no meio. Os métodos colorimétricos tais como a avaliação do conteúdo de compostos fenólicos totais por meio do reagente Folin Ciocalteu, o emprego do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-pictrazil), são avaliados por espectrofotômetro, nos diferentes comprimentos de onda necessários a cada ensaio e constituem sistemas simples de avaliação dos mais diversos alimentos existentes, devido ao fato de não serem específicos para uma determinada matriz (ARNOUS, MAKRRIS e KEFALAS, 2002; SELLAPPANS, AKOH e KREWER, 2002; HERTOOG, HOLLMAN e KATAN, 1992; MILLER 1971; MARCO, 1968).

Dada a importância dos compostos fenólicos antioxidantes presentes em uvas e também muito estudados em vinhos, torna-se importante avaliar também os outros produtos derivados dessa fruta, como a geleia de uva. Até o presente momento, há pouca produção científica voltada à geleia de uva como uma fonte de compostos antioxidantes e também alternativas de aumentar a concentração desses componentes benéficos nesse produto, por meio da modificação das variedades de uva utilizadas e da melhoria das etapas do processo de fabricação. Sendo assim, os objetivos desse trabalho foram produzir geleia de uva com a variedade Máximo (IAC-138-22), em alternativa às variedades Niágara e Isabel, que são comumente utilizadas no processamento, além de avaliar por meio de métodos espectrofotométricos a capacidade antioxidante desse novo

produto. Foi realizada uma etapa de desenvolvimento de formulação, tendo como base o maior conteúdo de compostos fenólicos totais, seguida de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para avaliar as melhores condições de extração dos compostos fenólicos antioxidantes dessa matriz e assim prosseguir com os métodos colorimétricos conteúdo de compostos fenólicos totais, estabilização do radical livre DPPH, método FRAP (Ferric Reducing Ability Plasma), sistema beta-caroteno ácido linoléico para avaliação da capacidade de co-oxidação e avaliação do conteúdo de antocianinas totais. Para identificação dos compostos fenólicos majoritários que possivelmente exercem esse potencial antioxidante *in vitro*, utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência (high performance liquid chromatography – HPLC), com detector do tipo de arranjo de diodos (DAD), coluna em fase reversa C-18 e fase móvel por gradiente com ácido ortofosfórico a 1% e acetonitrila.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, L. T.; DA MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis lambrusca* L. e *Vitis vinífera* L. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 27, 394-400, 2007.
- ALBUQUERQUE, J. P.; NACCO, R.; FARO, A. Avaliação global de geleias de uva por meio do método de dados difusos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 16, 250-254, 1996.
- ARNOUS, A.; MAKRRIS, D.; KEFALAS, P. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 655-665, 2002.

- FRANCIS, F.J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. *Cereal Foods World*, 45, 208-213, 2000.
- HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Content of potentially anti-carcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the The Netherlands. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 40, 2379-2383, 1992.
- IACOPINI, P., ET AL., Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro, antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*, doi:10.1016/j.jfca.2008.03.011, 2008.
- ISHIGE, K.; SCHUBERT, D.; SAGARA, Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biology & Medicine*, 30, 433-446, 2001.
- KATSUBE, N.; KEIKO, I.; TSUSHIDA, T.; YAMAKI, K.; KOBORI, M. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51, 68-75, 2003.
- LAGO, E. S.; GOMES, E.; SILVA, R. da. Produção de geleia de jabolão (*Syzygium cumini* Lamarck): processamento, parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 26, 847-852, 2006.
- LAPIDOT, T.; HAREL, S.; AKIRI, B.; GRANIT, R.; KANNER, J. pH-Dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 67-70, 1999.
- MALACRIDA, C.R.; MOTTA, S da. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 25, 659-664, 2005.
- MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Society*, 45, 594-598, 1968.
- MELLO, L. M. R. de. *Vinicultura Brasileira: Panorama 2007*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008. Disponível em: http://www.cnpqv.embrapa.br/publica/artigos/panorama_2007_vitivinicultura.pdf Acessado em: 03/2008.

- MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. *Journal of the American Oil Society*, 48, 91, 1971.
- RICE-EVANS C.A.; MILLER N.J.; PAGANGA G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* , 2,152-159, 1997.
- ROMERO-PÉREZ, A.I.; IBERN-GÓMES, M.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.; TORREBORONAT, M.C. Piceid, the major resveratrol derivative in grape juice. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 1533-1536, 1999.
- SCHRAMM, D.D.;YGERMAN,J.B. Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. *Journal of Nutrition & Biochemistry.*, 9, 560-566, 1998.
- SELLAPPANS, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 2432-2438, 2002.
- TSUDA, T; WATANABE, M.; OHSHIMA, K.; NORINOBU, S.; CHOI, S.W.; KAWAKISHI, S., OSAWA, T. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-β-D glucoside and cyanidin. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 42, 2407-2410, 1994.
- WANG, J., MAZZA, G. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages *Journal of Agricultural Food Chemistry* ,50, 4183-4189, 2002.

Conteúdo

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES DOS COMPOSTOS FENÓLICOS EM UVAS E DERIVADOS E SEUS MÉTODOS DE ANÁLISE.....	1
1. Geleia de Uva – Definição e Processamento.....	2
2. Geleia de Uva e Saúde.....	5
3. Compostos Fenólicos em Uvas e Derivados	8
4. Compostos Fenólicos em Resíduos da Indústria de Derivados de Uva	10
5. Análise de Compostos Fenólicos.....	11
5.1. Métodos de Extração	11
5.2 Atividade Antioxidante Dos Compostos Fenólicos.....	13
5.3. Separação e Quantificação dos Compostos Fenólicos	16
5.4. Análise Multivariada para Otimização da Extração de Compostos Fenólicos	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO DE GELEIA DE UVA COM APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO	39
RESUMO	40
ABSTRACT	41
1. INTRODUÇÃO.....	42
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
2.1. Reagentes.....	45

2.2. Produção de geleia.....	45
2.3. Extração de Compostos Fenólicos de uvas e de geleias	47
2.4. Avaliação de compostos fenólicos totais por Folin Ciocalteau	48
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1. Produção de Geleias	48
3.2. Avaliação de Compostos Fenólicos Totais por Folin Ciocalteau	50
4. CONCLUSÃO.....	53
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
CAPÍTULO 3: OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO POR ULTRA-SOM DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM GELEIAS DE UVA PRODUZIDAS COM A VARIEDADE IAC-138-22 (MÁXIMO).....	59
RESUMO	60
ABSTRACT	61
1. INTRODUÇÃO.....	62
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
2.1. Amostras.....	65
2.2. Reagentes.....	65
2.3. Extração de compostos fenólicos antioxidantes por ultra-som	65
2.4. Determinação de Compostos Fenólicos Totais	66
2.5. Determinação da Capacidade Antioxidante pelo radical livre DPPH•.....	66

2.6. Determinação da Capacidade Antioxidante pelo sistema Beta-caroteno/ Ácido linoléico	67
2.7. Delineamento experimental.....	68
2.8. Definição das variáveis do processo	69
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	70
4. CONCLUSÕES.....	79
CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE CASCA DE UVA NA FORMULAÇÃO DE GELEIAS EM RELAÇÃO AO SEU POTENCIAL ANTIOXIDANTE.....	84
RESUMO	85
ABSTRACT	86
1. INTRODUÇÃO.....	87
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	91
2.1. Reagentes.....	91
2.1. Produção e Extração de Geleia.....	91
2.2. Atividade antioxidante.	91
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
3.1. Análise do Potencial Antioxidante.....	96
4. CONCLUSÃO.....	102
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

CAPÍTULO 5: AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES EM GELEIA DE UVA POR HPLC.....	108
RESUMO	109
ABSTRACT	110
1. INTRODUÇÃO.....	111
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	114
2.1. Reagentes	114
2.2. Extração das Amostras	114
2.3. Equipamento e Condições Cromatográficas	115
2.4. Metodologia de Validação	115
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	116
4. CONCLUSÃO.....	123
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
CONCLUSÃO GERAL	129
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	131
ANEXOS	132
ANEXO I: Exemplo de Cromatograma dos padrões utilizados para o estudo.....	133
ANEXO II: Exemplo de cromatograma obtido na análise da formulação de geleia feita com a variedade IAC 138-22, sem adição de cascas secas à formulação. ...	134

ANEXO III: Exemplo de cromatograma obtido na análise da formulação de geleia feita com a variedade IAC 138-22, com adição de 3% em massa de cascas secas à formulação..... 135

ANEXO IV: Exemplo de cromatograma obtido na análise da formulação de geleia feita com a variedade IAC 138-22, com adição de 6% em massa de cascas secas à formulação..... 136

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES DOS
COMPOSTOS FENÓLICOS EM UVAS E
DERIVADOS E SEUS MÉTODOS DE ANÁLISE

Lucíula Lemos Lima Morelli¹, Marcelo Alexandre Prado¹

**Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6121, 13083-862, Campinas,
SP, Brasil.**

1. Geleia de Uva – Definição e Processamento

A uva é uma das frutas mais antigas consumidas pelo ser humano. Sua origem data de 6000 a.C., na região do Cáucaso, na Ásia, porém sua produção se espalhou por todo o mundo, sendo cultivada principalmente em regiões de clima temperado. Existem mais de 60 mil variedades dessa fruta, divididas em grandes subclasses, que são as uvas viníferas e as de mesa. As uvas de mesa tendem a apresentar bagos grandes, com peles finas. Já as uvas viníferas são normalmente menores, com muitas sementes, maior teor de açúcar e peles mais espessas, o que é desejável à produção de vinho.

Mundialmente, a maior parte da produção das videiras permanece destinada à industrialização do vinho, correspondendo a cerca de 80% da produção (FISCHER, ROTHB, CHRISTMANN, 1999; FERREIRA et al., 2004). O consumo *in natura* e as uvas destinadas ao processamento de outros derivados, dentre eles as geleias, representam, cada um, 10% da produção mundial (WALKER et al., 2007). No Brasil acontece uma situação contrária, em que a produção de uvas de mesa representa aproximadamente 85% da produção total de uvas, porém vem cedendo espaço pouco a pouco para a produção de uvas viníferas, desde o ano de 1998 (UVIBRA, 2009). Do total de uvas produzidas em território nacional no ano de 2006, 47% foram destinados à elaboração de vinhos, sucos, geleias e outros derivados (MELLO, 2007).

A geleia de uva é um dos derivados dessa fruta muito aceito pela população mundial, comumente usada para acompanhar pães, bolachas e afins, sendo ainda empregada em recheios de bolos e artigos de confeitaria (MELLO, 2007). Sua produção mundial surgiu no Oriente Médio, com os guerreiros das cruzadas, voltando para suas

casas. Depois começou a ser servida como iguarias pelas rainhas em seus castelos (QUEENSBERRY, 2010).

Os principais ingredientes utilizados para elaborar a geleia são: fruta (*in natura*, em pedaços, suco ou polpa), pectina, ácido cítrico, açúcar e água (ALBUQUERQUE, NACCO e FARO, 1996). Por se tratar de um alimento de processamento relativamente simples, com emprego de ingredientes de baixo custo, alguns autores apontam a geleia como uma alternativa viável para o aproveitamento econômico das frutas *in natura* (ALBUQUERQUE, NACCO e FARO, 1996; LAGO, GOMES e SILVA, 2006).

A Embrapa Uva e Vinho vêm estimulando produtores de uva de pequenas e médias propriedades a processar parte de suas colheitas na forma de geleia de uva, também com o intuito de aumentar a geração de renda a esses pequenos proprietários (EMBRAPA UVA E VINHO, 2007). O consumo de produtos derivados de uva, como geleias, pode apresentar vantagem com relação ao do vinho, já que a ausência de álcool permite que tais produtos sejam consumidos pela maioria das pessoas, inclusive crianças e pessoas portadoras de doenças, como, por exemplo, a hepatite (ROMERO-PÉREZ et al., 1999; MALACRIDA e MOTTA, 2005).

A Agência de Vigilância Sanitária estabelece que geleia de fruta seja o produto obtido pela cocção de frutas (inteiras ou em pedaços), polpa ou suco de frutas, com açúcar e água e concentrado até consistência gelatinosa. São classificadas em: comum (quando preparadas numa proporção de 40 partes de frutas frescas, ou seu equivalente, para 60 partes de açúcar) e extra (quando preparadas numa proporção de 50 partes de frutas frescas, ou seu equivalente, para 50 partes de açúcar) (ANVISA, 1978). O produto

não pode ser colorido nem aromatizado artificialmente, sendo tolerada a adição de acidulantes e de pectina, caso necessário, para compensar qualquer deficiência do conteúdo natural de acidez da fruta e/ou de pectina. A consistência deve ser tal que, quando extraída de seu recipiente, seja capaz de se manter no estado semi-sólido. O sabor deve ser doce, semi-ácido, de acordo com a fruta de origem (ANVISA, 1978). Essa definição difere do CODEX ALIMENTARIUS em alguns aspectos, visto que a quantidade mínima de fruta para ser considerada geleia e não “geleizada” deve ser 45%, e ainda existe a tolerância na utilização de determinados corantes e anti-espumantes durante o preparo do produto (CODEX STAN 296, 2009).

Os dados de produção de geleia de uva no Brasil não estão acessíveis por se tratar de um derivado de produção bem menor do que outros produtos (sendo muitas vezes de caráter artesanal), como vinho, suco e polpa de uva.

As variedades de uva mais comumente utilizadas para a fabricação de geleias no Brasil são as variedades Niágara Rosada e Isabel, que apresentam composições diferentes em relação aos compostos fenólicos, sendo a variedade Isabel mais rica em antocianinas, os pigmentos naturais da uva (POMMER et al., 1997; SILVA et al., 2008; SOARES et al., 2008). No presente trabalho, as geleias foram fabricadas com uvas da variedade Máximo, que é uma variedade de uvas viníferas produzidas atualmente no estado de São Paulo, Brasil, resultante do cruzamento das variedades Siebel e Syrah (SANTOS NETO et al., 1968). Essa variedade possui coloração roxa intensa, o que é uma característica muito positiva para a fabricação de geleias.

2. Geleia de Uva e Saúde

Atualmente muito se estuda a respeito da ingestão de uvas e vinhos, associando-os à prevenção de diversas doenças crônico-degenerativas, tais como doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer. Esses dois ingredientes fazem parte das conhecidas dietas mediterrâneas, apontadas como uma das razões da redução da taxa de mortalidade da população local (SIMOPOULOS, 2001). Os estudos realizados para correlacionar essas dietas aos efeitos benéficos à saúde humana relatam que o consumo moderado de etanol na forma de vinho e a elevada ingestão de frutas, dentre elas as uvas, possui papel relevante para aumentar as ações antiinflamatórias, antioxidantes e anticarcinogênicas (SAURA-CALIXTO & GONI, 2009).

O fato de haver correlação direta entre ingestão de uvas e vinhos com as virtudes para a saúde é porque, entre as frutas, a uva é uma das maiores fontes de compostos fenólicos, compostos esses que apresentam significativo poder antioxidante. (ABE et al., 2007; FRANCIS, 2000). Antioxidantes são definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, são capazes de inibir ou retardar substancialmente a oxidação desses substratos por meio da doação de hidrogênios ou elétrons para neutralizar os radicais livres. Os antioxidantes não se tornam radicais livres pela doação de elétrons, visto que eles são estáveis em ambas as formas, possibilitando, assim, atribuir a tais compostos um efeito benéfico em relação à prevenção de enfermidades cardiovasculares, circulatórias, cancerígenas e neurológicas (IACOPINI et al., 2008; KATSUBEN et al., 2003; WANG e MAZZA, 2002; ISHIGE, SCHUBERT e SAGARA, 2001; LAPIDOT et al., 1999; LUIS & ALLER, 2008;

OÇONNELLA & FOXA, 2001; SCHRAMM e YGERMAN, 1998; HALL e CUPPET, 1997; RICE-EVANS, MILLER e PAGANDA, 1997; TSUDA et al., 1994).

Os compostos fenólicos presentes em uvas e derivados têm importante papel na saúde humana. As catequinas são flavonóides que atuam como antioxidantes e sequestrantes de radicais livres, proporcionando comportamento quimio-preventivo, bem como proteção contra doenças coronárias e atenuação da alta pressão sanguínea, comprovadas em estudos com ratos, *in vitro* e em humanos (DU & LOU, 2008; FERNANDES et al., 2008; Neiva et. al., 2008; YILMAZ & TOLEDO, 2004; ARNOUS, MAKRIS & KEFALAS, 2002 FRANKEL et al.,1995; FRANKEL et al., 1993 MEYER et al., 1998;). São compostos comumente encontrados em maior abundância, tanto em vinhos tintos como brancos, juntamente com o ácido gálico, sendo suas quantidades diretamente correlacionadas com a maior capacidade antioxidante do produto (DI MAJO et. al., 2008; MAMEDE & PASTORE, 2004). Outros flavonóis muito estudados em relação aos seus potenciais benéficos à saúde são a quercetina, o kaempferol, a miricetina, a rutina, entre outros, cujas contribuições são diversas, podendo ser citado o fato contribuírem nas reações de oxi-redução devido à possível indução da produção de enzimas detoxificantes durante o metabolismo de mamíferos, além de haver muitos estudos apontando o auxílio na diminuição de lipoproteínas de baixa densidade, atenuação do stress oxidativo, melhoria da resposta antiinflamatória em órgãos lesionados, e competição com enzimas precursoras de câncer de pele (CHEN et. al., 2008; KIM et al., 2008; FANG et. al, 2008; MARTINEZ et al., 2008; COSTA et al., 2008; WILLIAMS et al., 2004; HAVSTEEN, 2002; HAYEK et al.,1997, citado por

GIEHL et al., 2007). Esses flavonóides tão benéficos são comumente encontrados em uvas e derivados, podendo estar presentes em quantidades significativas na geleia.

A capacidade antioxidante em frutas contendo estilbeno está recebendo muita atenção devido ao potencial preventivo dessas substâncias para algumas doenças crônicas (LEE & RENNAKER, 2007; LÓPEZ-VÉLEZ, MARTINEZ-MARTINEZ, & DEL VALLE-RIBES, 2003; BAHT, KOSMEDER, & PEZZUTO, 2001). Os estilbenos podem ser encontrados tanto nas frutas *in natura*, tais como a uva, quanto em seus produtos derivados, e seus efeitos cardioprotetores e anti-leucêmicos têm sido demonstrados tanto em ratos quanto em humanos (URPI-SARDA ET AL., 2005; GAO ET AL., 2002; HUNG et al, 2000; VIRGILI & CONTESTABILE, 2000). O resveratrol (3,4,5-trihidroxiestilbeno) é o mais conhecido composto dessa classe, sendo um dos metabólitos secundários produzidos pelas plantas que mais contribui para o potencial benéfico dos vinhos (STERVBO, VANG, & BONNESEN, 2007; MORENO-LABANDA ET AL., 2004; BAVARESCO, 2003; BURNS ET AL., 2001; GOLDBERG & NG, 1996; SIEMANN & CREASY, 1992;), além de ser apto a mediar processos antiinflamatórios, principalmente por inibir a expressão de enzimas catalisadoras de processos de toxicidade para o organismo e também inibir a formação de hidroperóxidos e agregação plaquetária (SAKKIADI ET al, 2001; FRÉMONT, 2000). Ele também mostrou ter propriedades estrogênicas para diferentes tipos de células (KING ET al., 2006; FRÉMONT, 2000).

Os estudos correlacionando uva e derivados com a saúde humana não contemplam a geleia. Apesar disso, justamente pelo fato de se tratar de um produto cuja

matéria-prima apresenta-se como uma importante fonte de compostos benéficos à saúde, merece destaque em estudos científicos com intuito de avaliar se tais compostos benéficos ainda podem ser encontrados após o processamento.

Em seu estudo com geleia de ameixa preta, MOTA (2006) relata que o processamento na forma de geleia reduz o teor de antocianinas, compostos com significativo potencial antioxidante, porém o produto pode ser considerado como fonte deste composto devido aos elevados teores observados, mesmo após três meses de armazenamento na presença de luz e temperatura média de 20 °C. FALCÃO et al. (2007) relatam que o processamento, não altera significativamente a quantidade de antocianinas totais e que a temperatura de extração das antocianinas a 70°C auxilia na sua transferência para o mosto que é utilizado para a fabricação de geleia.

3. Compostos Fenólicos em Uvas e Derivados

O desenvolvimento dos bagos de uva expostos ao sol na etapa pré-colheita faz com que os frutos necessitem de produzir elevada quantidade de compostos antioxidantes com a finalidade de proteção contra os efeitos nocivos da exposição prolongada à luz solar. A síntese de compostos fenólicos como antocianinas é ativada pela irradiação de luz branca, proporcionando frutos de coloração escura. Além da proteção contra a luz solar, os frutos produzem compostos fenólicos com a finalidade de proteção contra agentes microbianos e predadores herbívoros (SILVA et al., 2008; PIETTA, 2000).

Tanto para a vinicultura quanto para a produção de seus derivados, os fenólicos têm papel importante na qualidade, pois contribuem para as propriedades sensoriais, em particular a cor, o sabor, o amargor e a adstringência (VALENTÃO et al., 2005; VILLIERS ET AL., 2004; GAMBELLI & SANTARONI, 2004; ZAFRILLA et al., 2003; ATANASOVA et al. 2002; ANDRADE et al., 2001(a); ANDRADE, et al., 2001 (b); REVILLA et al, 2001; MACHEIX, FLEURIET, & BILLOT, 1990; RAMOS et al., 1999). As antocianinas, por exemplo, são polifenóis importantes nas uvas vermelhas, sendo sua presença um dos motivos do fruto vermelho e seus derivados conterem maior quantidade de compostos fenólicos, chegando essa quantidade em vinhos tintos a representar de 8 a 20 vezes a quantidade presente nos vinhos brancos (MAKRIS et al. 2006; MAMEDE & PASTORE, 2004; SILVERTSEN et al., 1999; BRAVO, 1998; BOURZEIX et al., 1986; CHEYNIER & RIGAUD, 1986). Mas há que se ressaltar que, para o vinho, a diferença encontrada não se deve só às antocianinas, mas também ao processo, que pode influenciar no conteúdo de fenólicos, aumentando durante a fase de esmagamento da polpa da fruta com a casca e a semente (MAMEDE & PASTORE, 2004; FANKEL, WATERHOUSE & TEISSEDRE, 1995; KANNER et al., 1994; AMERINE & JOSLYN, 1987). Além da diferença entre colorações de uvas, dentro da mesma variedade foi constatado que as uvas de mesa podem conter menor quantidade de compostos fenólicos que as destinadas para fabricação de vinho (LIANG et al, 2008).

A maioria dos compostos fenólicos é encontrada na natureza na forma conjugada, principalmente na forma glicosilada, ou seja, com moléculas de açúcares ligadas a elas. O processamento em derivados não alcoólicos de uva não é suficiente para promover a

hidrólise dos flavonóides, porém a fermentação alcoólica do vinho possibilita essa dissociação, o que, de acordo com HOLLMAN et al. (1995), favorece a absorção dessas substâncias pelo organismo humano. Apesar da diferença em absorção, estudos mostram atividade antioxidante similar entre os compostos fenólicos glicolisados e as suas respectivas agliconas (VINSON et al., 1999; FRANKEL et al., 1998; SHAHIDI e NACZK, 1995).

4. Compostos Fenólicos em Resíduos da Indústria de Derivados de Uva

A indústria de derivados de uva gera diferentes produtos processados e desses obtém-se subprodutos como cascas e sementes, que constituem o resíduo da industrialização da uva. Uvas são usualmente amassadas para obter o suco, deixando o resíduo fresco como subproduto. Sementes de uvas são consideradas subprodutos valiosos para extração de óleo (KAMEL e DAWSON, 1985) e suas cascas têm sido usadas para a produção de taninos (PRUTHI, 1971). Assim, o resíduo de uva constitui um subproduto de grande interesse para a indústria de alimentos (VALIENTE et al., 1995).

O material composto principalmente por cascas providas da manufatura do vinho apresenta efeito vaso relaxante e atividade antioxidante, além de elevados níveis de fibras e polifenóis, sendo essa a fração mais rica em antocianinas e resveratrol do fruto. Sendo assim, é interessante utilizá-lo na elaboração de novos produtos com capacidade de promoção de saúde, ou no enriquecimento de produtos já existentes, como a geleia de uva (BERTAGNOLLI et al., 2007; RUBERTO et al., 2007; LURTON, 2003;

KATSUBE et al., 2003; KONG et al., 2003; KÄHKÖNEN & HEINONEN, 2003; KALLITHRAKA et al., 2001; FRANKEL, 1999; THRELFALL et al., 1999; GHISELLI et al., 1998; LAMUELA RAVENTOS et al., 1997; WANG, CAO, & PRIOR, 1997; RICE-EVANS, MILLER & PAGANGA, 1997; SAURA-CALIXTO e LARRAURI, 1996; SOLEAS et al., 1995; JEANDET et al., 1991; SIMIC & JOVANOVIC, 1994; FITZPATRICK, HIRCHFIELD e COFFEY, 1993).

Apesar de todos os compostos benéficos presentes nas cascas de uva, que as tornam interessantes como um ingrediente adicional em geleias, um fator negativo de sua adição durante o processamento em derivados é que os ácidos graxos insaturados presentes na casca podem gerar “gostos herbáceos”, por meio de diversas reações de oxidação enzimática, que resultam em alcoóis e aldeídos. Durante a fermentação, esses aldeídos poderão ser transformados em seus respectivos alcoóis, com sabores mais toleráveis (AZEVEDO et al., 2007; ESCUDERO et al., 2002; LEVART & VEBER, 2001; ZEA et al., 2001).

5. Análise de Compostos Fenólicos

5.1. Métodos de Extração

A extração dos compostos fenólicos da matriz constitui uma das etapas mais importantes do processo de análise, pois ela deve promover o maior rendimento possível dessas substâncias, além de se ter como alvo a especificidade, ou seja, eliminar todos os compostos considerados interferentes da matriz. Para tanto, as técnicas mais utilizadas na

literatura são a extração líquido-líquido (LLE) ou extração sólido-líquido (SLE), para o caso de matrizes sólidas, e a extração em fase sólida (SPE).

Para a SLE e LLE comumente se utiliza metanol como solvente, ou soluções desse álcool com água, agitando-se vigorosamente para acelerar a partição e seguindo-se a filtração. Porém outros autores também testaram diferentes solventes, tais como etanol, acetonitrila, ácido clorídrico e acético, dentre outros. Havendo somente a etapa de LLE ou SLE, o solvente de extração é evaporado após a filtração e o extrato é novamente re-suspendido a um volume conhecido previamente à análise dos compostos fenólicos (ALÉN-RUIZ et al., 2009; DOWNEY & ROCHFORT, 2008; MEZADRI et al., 2008; SPACIL et al., 2008; VIÑAS et al., 2008; DOPICO-GARCIA et al., 2007; McCALLUM et al., 2007; BRAVO et al., 2006; GOMÉZ-ALONSO et al., 2007; MATEJICEK et al., 2005; ANDRADE et al., 2001(a)).

Na tentativa de empregar solventes menos tóxicos, além de melhorar a eficiência de extração, alguns autores trocaram o metanol por etanol na análise de fenólicos. Estes também utilizaram a técnica de extração por ultra-som, devido ao fato das ondas ultrassônicas possibilitarem melhor contato do solvente com o analito de interesse (VIROT et al., 2009; WANG, 2008; WANG & WELLER, 2006; ROSTAGNO, PALMA & BARROSO, 2003).

A técnica de SPE normalmente é realizada posteriormente à LLE ou SLE. É uma técnica versátil aos tipos de matrizes cuja extração pode ser feita por esse processo. Por meio da técnica de SPE é possível concentrar compostos presentes em traços e também eliminar aqueles interferentes de características muito próximas ao seu analito de

interesse, que a SLE e LLE não conseguem separar. O método consiste na utilização de cartuchos, cujo material de recheio é semelhante ao das colunas de HPLC. O recheio mais comum utilizado é o C18, porém pesquisadores como MATEJICEK et al. (2005) utilizaram outros sorbentes poliméricos obtendo boas taxas de recuperação em comparação com C18. Esses cartuchos necessitam de condicionamento antes do processo de extração e normalmente isso é feito com os solventes que foram utilizados ao longo da eluição. Os solventes mais popularmente utilizados para a SPE são metanol, metanol a pH ácido, acetato de etila e água a pH ácido (menor de 3). Há também os estudos que utilizam soluções-tampão, como o tampão-fosfato (DOPICO-GARCÍA et al., 2007; LEE et al., 2007; ANDRADE et al., 2001(a); CHEN et al., 2008; BUIARELLI et al., 1995).

5.2 Atividade Antioxidante Dos Compostos Fenólicos

Diversos trabalhos relacionam a capacidade antioxidante com a quantidade de compostos fenólicos totais e antocianinas (ISHIGE, SCHUBERT e SAGARA, 2001; ROBERTS e GORDON, 2003; PINELO et al., 2004). KUSKOSKI et al. (2005) relataram possível relação entre a quantidade de fenólicos totais e a ação antioxidante entre os métodos por DPPH e ABTS em polpas de frutas.

Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante, podendo ser *in vitro* ou *in vivo* (ANTOLOLOVICH et al., 2002; CINTRA e MANCINI-FILHO, 1992). A determinação da atividade de um antioxidante frente a radicais livres consiste em uma das estratégias mais utilizadas para aferições *in vitro*. Nesses métodos a perda de cor do

radical livre ocorre de forma proporcional com a concentração de compostos fenólicos na amostra (ARENA, FALLICO e MACCARONE, 2001). A diversidade de métodos colorimétricos para avaliação do potencial antioxidante se deve ao fato de se tratar de substratos muito complexos, cujo conteúdo de dezenas de compostos apresenta diferentes grupos funcionais, polaridades e comportamento químico.

Diversos compostos cromóforos como ABTS, DPPH[•], DPMO e FRAP, são utilizados para determinar a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos presentes em frutos baseando-se na captura dos radicais livres gerados, operando, dessa forma, contra os efeitos prejudiciais dos processos de oxidação que levam à formação de espécies reativas do oxigênio (EROS) (HERTOG, HOLLMAN e KATAN, 1992; ARNOUS, MAKRRIS e KEFALAS, 2002; SELLAPPANS, AKOH e KREWER, 2002). Outros métodos, tais como o sistema beta-caroteno/ácido linoléico, apresentam mecanismo de co-oxidação, ou seja, se oxidando preferencialmente aos compostos presentes no sistema.

O método DPPH é um dos mais utilizados entre os métodos químicos aplicados para determinar a capacidade de um composto em capturar radicais livres, por ser considerado prático, rápido e estável (ESPIN et al., 2000). O DPPH (1,1-difenil-2-pictrazil) é um radical livre estável devido à possibilidade de deslocamento de seus elétrons na molécula. Esse deslocamento confere a ele uma intensa coloração púrpura, com comprimento de onda de absorção ao redor de 520 nm (SZABO et al., 2006). Nesse método, o antioxidante reage com o radical DPPH, doando a ele um átomo de hidrogênio e convertendo-o em sua forma reduzida (DPPH-H). Nesta reação, a solução metanólica

de DPPH, inicialmente de coloração violeta intensa, torna-se amarelada e o grau deste descoramento indica a habilidade do antioxidante em seqüestrar o radical livre. (BRAND-WILLIANS et. al., 1995; HUANG e PRIOR, 2005).

O funcionamento do método FRAP (Ferric Ability Reducing of Plasma) trata-se de, em um meio a baixo pH, em que o composto antioxidante é capaz doar um elétron ao complexo íon Ferro 3^+ - TPTZ, reduzindo-o a Fe^{2+} - TPTZ, o que resulta em uma coloração azul intensa, com absorbância ao redor de 593nm (BENZIE & STRAIN, 1996).

O método de oxidação do beta-caroteno /ácido linoléico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do beta-caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico, ou seja, ocorre co-oxidação. (MARCO, 1968; MILLER, 1971).

Em síntese, o método beta-caroteno/ácido linoléico determina a capacidade de uma amostra ou de um composto de proteger um substrato lipídico da oxidação, enquanto que o método de inibição de radicais DPPH baseia-se na transferência de hidrogênio de um composto antioxidante para estabilizar um radical livre e o método FRAP promove a redução do íon ferro por meio de doação de elétrons do composto antioxidante para esse íon. Considerando que cada método está focado em uma determinada ação antioxidante da substância em questão, além da enorme variedade de compostos fenólicos presentes na uva e seus derivados, cada um com seu mecanismo de

atuação, é interessante expressar a capacidade antioxidante por meio de mais de um dos métodos colorimétricos.

5.3. Separação e Quantificação dos Compostos Fenólicos

Apesar das técnicas colorimétricas serem importantes ferramentas de detecção *in vitro* da presença de compostos fenólicos, é importante realizar a cromatografia conjuntamente ao trabalho, com a finalidade de separação e quantificação dos compostos fenólicos individuais. Nesse contexto, a cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography- HPLC) é a técnica mais comumente utilizada, podendo estar acoplados a ela detectores como o de arranjo de diodos (DAD), como o por fluorescência ou por espectrometria de massas (MS). A utilização da HPLC é uma ferramenta que auxilia os mais variados estudos, pois separa compostos presentes em uma matriz, que podem ser comparados a padrões para identificação (HO, HOGG & SILVA, 1999; HÄKKINEN et al, 1999; PEREZ-MAGARIÑO et al, 1999; SCHIEBER et al, 2001; BIANCO et al, 1997; ANDRADE et al 2001(a); KALLITHRAKA et al, 2001).

Grande parte dos autores utiliza a caracterização cromatográfica por HPLC empregando coluna em fase reversa C18 (RP-HPLC) (BUIARELLI et al 1995; LOPEZ et al, 2001; ESCARPA et al, 2000). Este fato pode ser observado por se tratar de uma coluna facilmente utilizável para uma gama variada de compostos, relativamente barata e que suporta ampla variação de pH (entre 1.0 a 12.0), facilitando a utilização de vários solventes como fase móvel.

Para detecção de compostos fenólicos em uva e seus derivados, utilizam-se diferentes solventes como fase móvel, empregados muitas vezes em um mesmo método de corrida cromatográfica, em concentrações que variam com o tempo, sendo comumente utilizada eluição por gradiente, que pode diminuir significativamente os tempos de corrida. Esses solventes, que podem ser metanol, água, acetonitrila, soluções-tampão, tais como fosfato ou acetato, atuam aumentando ou diminuindo a polaridade do meio, no intuito de melhorar a separação entre os compostos (ALÉN-RUIZ et al., 2009; BAER et al., 2008; MEZADRI et al., 2008; MASA & VILANOVA, 2008; GARCÍA-FALCÓN et al., 2007; GÜRBÜZ et al., 2007; PEREZ-LAMELA et al., 2007; MASA et al., 2007; VALENTÃO et al. 2007; LOPEZ et al., 2001; ESCARPA & GONZALEZ, 1998; ESCARPA & GONZALEZ, 2000; OLIVEIRA, 2010).

Em se tratando de detectores, o mais frequentemente utilizado para detecção de compostos fenólicos é o DAD, por tratar-se de um equipamento que pode realizar varredura em um amplo espectro de comprimentos de onda, compatível com a grande variedade de moléculas que são os compostos fenólicos (MEZADRI et al., 2008). Apesar disso, o detector por fluorescência também pode beneficiar a identificação de compostos fenólicos durante a separação cromatográfica. GOMÉS-ALONSO et al. (2007) compararam o detector DAD e o detector por fluorescência para compostos fenólicos e notaram que o último pode promover a diminuição do limite de quantificação de alguns compostos como as catequinas e evitar a interferência causada entre alguns compostos fenólicos presentes.

Ainda que se compare o tempo de retenção e o espectro de absorção de cada composto com os seus respectivos padrões, quando se acopla o HPLC ao MS esta se torna a melhor ferramenta utilizada na confirmação de compostos. Ela dispensa a necessidade de padrões, que na maioria são muito caros, apresenta limites de detecção menores que os demais detectores e auxilia na detecção de compostos que co-eluíram por meio das diferentes razões massa/carga (m/z) apresentadas (GUERRERO et al., 2009; DOWNEY & ROCHFORD, 2008; KÖHLER et al., 2008; MCCALLUM et al., 2007; BRAVO et al., 2006). A grande desvantagem desse detector é que ele custa muito mais caro que o próprio cromatógrafo, o que faz com que a maioria dos trabalhos encontrados na literatura ainda esteja com detecção por DAD.

5.4. Análise Multivariada para Otimização da Extração de Compostos Fenólicos

A extração de compostos fenólicos antioxidantes por SLE segue o seguinte procedimento: pesagem da amostra, suspensão do solvente de interesse, com volume conhecido e agitação para acelerar o processo de extração. Ela é comumente utilizada em plantas e tem havido desenvolvimento de novos métodos ambientalmente corretos, com técnicas que promovem decréscimo do consumo de solventes e aumento no rendimento de extratos (WANG et al., 2008; WANG & WELLER, 2006). Essas etapas variam consideravelmente na literatura, em relação ao solvente de extração, temperatura, equipamento de agitação, podendo ainda envolver outras etapas. Para otimizar essas etapas, é possível empregar análise estatística multivariada, que gerará uma superfície de resposta, indicando qual é a melhor combinação de fatores para gerar a melhor extração.

Ao se realizar a análise estatística multivariada, primeiramente se faz um planejamento experimental, determinando as variáveis e seus respectivos intervalos de interesse. Então é elaborado um planejamento estatístico, determinando quantos foram os experimentos que deverão ser testados, e realizá-los de forma aleatória. De posse dos resultados obtidos com os experimentos, prossegue-se para a análise de variância (ANOVA), verificando se há ou não falta de ajuste do modelo estatístico aos resultados reais (RODRIGUES & IEMMA, 2005; BARROS NETO, SCARMINO & BRUNS, 2003).

Quando os fatores de interesse envolvidos não ultrapassam cinco, como por exemplo um experimento que envolve estudo de temperatura, tempo e concentração, uma boa alternativa é a utilização do delineamento composto central rotacional (DCCR), que abrange ampla região de estudo com relativamente poucos ensaios. Após definidas as variáveis, são definidos os valores mínimos e máximos para cada uma, sendo esses os níveis do experimento. Adicionam-se também os pontos centrais e axiais, com intuito de se obter resultados suficientes para a estimativa dos parâmetros propostos. Assim, após a realização do planejamento estatístico, este trará a informação de quantos ensaios são necessários ao DCCR, bem como as combinações entre os parâmetros necessários em cada ensaio (RODRIGUES & IEMMA, 2005; BARROS NETO, SCARMINO & BRUNS, 2003). Essa técnica foi utilizada em alguns trabalhos cujo objetivo era extrair fenólicos de matrizes sólidas, sendo os resultados obtidos bem satisfatórios, o que instaura a necessidade de investigar como se comporta a extração de fenólicos na matriz

geleia de uva (VIROT et al., 2009; WANG, 2008; WANG & WELLER, 2006; ROSTAGNO, PALMA & BARROSO, 2003).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, L. T.; DA MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis lambrusca* L. e *Vitis vinífera* L. *Ciência Tecnologia Alimentos*, Campinas, v 27, p 394-400, 2007.
- ALBUQUERQUE, J. P.; NACCO, R.; FARO, A. Avaliação global de geleias de uva por meio do método de dados difusos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v 16, p 250-254, 1996.
- ALÉN-RUIZ, F.; GARCÍA-FALCÓN, M. S.; PÉREZ-LAMELA, M. C.; MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; SIMAL-GÁNDARA, J. Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines. Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines. *Food Chemistry*, v 113, Issue 1, p 53 – 60, 2009.
- AMERINE, A.; JOSLYN, M. A. Composition of grapes and distribution of phenolics from table wines, the technology of their production. Berkeley: University of California Press, p 234-238, 1987.
- ANDRADE, P. B.; MENDES, G.; FALCO, V.; VALENTÃO, P.; SEABRA, R. M. - Preliminary study of flavonols in port wine grape varieties - *Food Chemistry*, v 73; p 397-399, 2001. (a).
- ANDRADE, P. B., OLIVEIRA, B. M., SEABRA, R. M., FERREIRA, M. A., FERRERES, F., & GARCÍA-VIGUERA, C. Analysis of phenolic compounds in Spanish Albariño and Portuguese Alvarinho and Loure Loureiro wines by capillary zone electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Electrophoresis*, v 22, p 1568–1572, 2001.

- ANTOLOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, v 127, p 183-198, 2002.
- AOAC - Official methods of analysis of the association of the official analysis chemists. Arlington, Virginia: Association of Official Analytical Chemists, 16 th edition, 1995.
- ARENA, E.; FALLICO, B.; MACCARONE, E. Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. *Food Chem.*, v 74, p 423-427, 2001.
- ARNOUS, A.; MAKRRIS, D.; KEFALAS, P. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *Journal of Food Composition Analysis*, v 15, p 655-665, 2002.
- ANVISA.Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Gerência-Geral Alimentos. Resolução -CNNPA nº 12, de 1978, D.O. de 24/07/1978. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_78.pdf. Acessado em: 03/08.
- ATANASOVA, V., FULCRAND, H., CHEYNIER, V., & MOUTOUNET, M. (2002). Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making. *Analytica Chimica Acta*, v 458, p 15–27.
- AZEVEDO, L. C. de, REIS, M. M., SILVA, L. A. da; ANDRADE, J.B. de. Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. *Química Nova* [online]. v 30, n. 8, p. 1968-1975, 2007.
- BAER, D. v.; RENTZSCH, M.; HITSCHFELD, M.A.; MARDONES, C.; VENGARA, C.; WINTERHALTER, P. Relevance of chromatographic efficiency in varietal authenticity verification of red wines based on their anthocyanin profiles: Interference of pyranoanthocyanins formed during wine ageing. *Analytica Chimica Acta*, v 621, p 52–56, 2008.
- BAHT, K. P. L., KOSMEDER, J. W., II, & PEZZUTO, J. M. Biological effects of resveratrol. *Antioxidants and Redox Signaling*, v 3(6), p 1041–1064, 2001.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; Planejamento e Otimização de Experimentos, 2a ed., Editora Unicamp, Campinas, SP, p 60-131, 1996.

- BAVARESCO, L. Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine. *Drugs under experimental and clinical research*, v 29(5-6), p 181–187, 2003.
- BENZIE, I.F.F. e STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, v 239(1): p 70-76, 1996.
- BERTAGNOLLI, S. M. M., ROSSATO, S. B., SILVA, V.L. *et al.* Influence of the carbonic maceration on the levels of trans-resveratrol in cabernet sauvignon wine. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas*, v 43, n 1, p. 71-77, 2007.
- BIANCO, M.A.; SAVOLAINEN, H. - Phenolic acids as indicators of wood tannins - *The Science of the Total Environment*; v 203, p 79-82, 1997.
- BOURZEIX, M., WEYLAND, D., HEREDIA, N., . Étude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d’autres de´rive´ s de la vigne. *Bulletin de l’O.I.*, v 669–670, p 1175–1254, 1986.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, v 28, p 25-30, 1995.
- BRAVO, L. Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional 248 B.CEPPA, Curitiba, v. 22, n. 2, jul./dez. 2004 significance. *Nutr. Rev.*, v. 56, p. 317-333, 1998.
- BRAVO, M. N.; SILVA, S.; COELHO, A. V.; VILAS BOAS, L.; BRONZE, M. R. Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. *Analytica Chimica Acta*, v 563, p 84 – 92, 2006.
- BUIARELLI, F.; CARTONI, G.; COCCIOLI, F.; LEVETSOVITOU, Z. - Determination of phenolic acids in wine by high-performance liquid chromatographic with a microbore column - *Journal of Chromatography A*; v 695; p 229-235, 1995.
- BURNS, J., GARDNER, P. T., MATTHEWS, D., DUTHIE, G. G., LEAN, M. E. J., & CROZIER, A. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, p 49(12), p 795–808, 2001.
- CINTRA, R.M.G.; MANCINI-FILHO, J. Efeito antioxidante de especiarias: avaliação e comparação de métodos in vitro e in vivo. *Nutrire*, v 22, p 49-62, 1992.

- CHEN, G. ;MA, X.; MENG, F.; LI, G. The electron transfer reactivity of kaempferol and its interactions with amino acids residues. *Bioelectrochemistry*, v 72, Issue 2, p 169 - 173, 2008, p 169-173.
- CHEYNIER, V., RIGAUD, J., 1986. HPLC separation and characterization of flavonols in the skins of *Vitis vinifera* var. Cinsault. *American Journal of Enology and Viticulture*, v 37, p 248–252, 1986.
- CODEX STAN 296. Codex Standard for Jam, Jellies and Marmalades. Codex Alimentarius Commission, FAO/WHO. Available in: http://www.codexalimentarius.net/search/advancedsearch.do/download/standards/11254/CXS_296e.pdf. Acesso em: 09/05/2010.
- COSTA, E.M. de M. B., PIMENTA, F.C., LUZ, W. *C. et al.* Selection of filamentous fungi of the *Beauveria* genus able to metabolize quercetin like mammalian cells. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, n. 2 , p. 405-408, 2008.
- DASTMALCHI, K.; DORMAN, H.J.D.; OINONEN, P.P.; DARWIS, Y.; LAAKSO, I.; HILTUNEN, R. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *LWT*, v 41, 391 – 400, 2008.
- DI MAJO, D.; LA GUARDIA, M.; GIAMMANCO, S.; LA NEVE, L.; GIAMMANCO, M. The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *Food Chemistry*, v 111, p 45–49, 2008.
- DOPICO-GARCÍA,M.S.; VALENTÃO, P.; GUERRA, L.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, P.B. Experimental design for extraction and quantification of phenolic compounds and organic acids in white “Vinho Verde” grapes. *Analytica Chimica Acta* , v 583, p 15–22, 2007.
- DOWNEY,M.O.; ROCHFORT,S.. Simultaneous separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectral identification of anthocyanins and flavonols in Shiraz grape skin. *Journal of Chromatography A*, v 1201, p 43–47, 2008.

- DU, Y & LOU, H. Catechin and proanthocyanidin B4 from grape seeds prevent doxorubicin-induced toxicity in cardiomyocytes. *European Journal of Pharmacology* v 591, p 96–101, 2008.
- EMBRAPA UVA E VINHO - Cultivo da Videira Niágara Rosada em Regiões Tropicais do Brasil. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvaNiagaraRosadaRegioesTropicais/mercado.htm>. Acesso em: 06/08/2008.
- EMBRAPA UVA E VINHO. Processamento de Uva na Propriedade Rural. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/documentos/doc064.pdf>. Acesso em: 29/04/2010.
- ESCARPA, A.; GONZALEZ, M.C. - Optimization strategy and validation of one chromatographic methods as approach to determine the phenolic compounds from different sources. - *Journal of Chromatography A*; v 897; (1); p 161-170, 2000.
- ESCARPA, A.; GONZALEZ, M.C. - High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties - *Journal of Chromatography A*; v 823, (2), p 331–337, 1998.
- ESCUADERO, A.; ASENSIO, E.; CACHO, J.; FERREIRA, V.; Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants *Food Chemistry*, v 77, p 325, 2002.
- ESPIN, J.C.; SOLOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H.J.; GARCIA-VIGUERA, C. Anthocyanin-based natural colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 48, p 1588-1592, 2000.
- FALCÃO, A. P.; CHAVES, E. S.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R.; FALCÃO, L. D.; BORDIGNON – LUIZ, M. T. Índice de polifenóis, antocianinas totais e atividade antioxidante de um sistema modelo de geleia de uvas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v 27, n.3, p 637-642, 2007.

- FANG, X. K.; GAO, J.; ZHU, D.N. Kaempferol and quercetin isolated from *Euonymus alatus* improve glucose uptake of 3T3-L1 cells without adipogenesis activity. *Life Sciences*, v 82, Issues 11-12, p 615-622, 2008.
- FERREIRA, E.A.; REGINA, M. A.; CHALFUN, N.N.J.; ANTUNES, L. E. C. Antecipação De Safra Para Videira Niágara Rosada Na Região Sul Do Estado De Minas Gerais. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 28, n. 6, p. 1221-1227, 2004.
- FERNANDES, S. C.; OSÓRIO, R. E.M.B.; dos ANJOS, A.; NEVES, A.; MICKE, G.A.; VIEIRA, I.C. Determination of Catechin in Green Tea using a Catechol Oxidase Biomimetic Sensor. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v 19, n 6, p1215-1223, 2008.
- FISCHER, U.; ROTHB, D.; CHRISTMANN, M. - The impact of geographic origin; vintage and wine estate on sensory properties of *Vitis vinifera* cv. Riesling wines. - *Food Quality and Preference*, v 10, p 281-288, 1999.
- FITZPATRICK, D.F.; HIRSCHFIELD S.L.; COFFEY, R.G. Endothelium-dependent vaso-relaxing activity of wine and other products. *American Journal of Physiology*, v 265, p 774-778, 1993.
- FRANCIS, F.J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. *Cereal Food World*, v 45, p 208-213, 2000.
- FRANKEL, E.N., KANNER, J., GERMAN, J.B., PARKS, E., KINSELLA, J.E., 1993. Inhibition of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, v 341, p 454-457.
- FRANKEL, E.N., WATERHOUSE, A.L., TEISSEDRE, P.L., 1995. Principal phenolic Phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 43, p 890-894, 1995.
- FRANKEL, E.N.; BOSANEK, C.A.; MEYER, A.S.; SILLIMAN, K.; KIRK, L.L. Commercial grape juice inhibits the in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 46, p 834-838, 1998.

- FRANKEL, E. N (1999). Food antioxidants and phytochemicals. Present and future perspectives. *Fett-Lipid*, v 101(12), p 450–455.
- FREITAS, A. A. de, FRANCELIN, M. F., HIRATA, G. F. *et al.* Atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) nas uvas das cultivares benitaka e rubi e em seus sucos e geleias. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v 28, n. 1 p 172-177, 2008.
- FREMONT, L., 2000. Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*, v 66, p 663–673, 2000.
- GAO, X., YONG, X. X., DIVINE, G., JANAKIRAMAN, N., CHAPMAN, R. A., & GAUTAM, S. C. Disparate in vitro and in vivo antileukemic effects of resveratrol, a natural polyphenolics compound found in grapes. *Journal of Nutrition*, v 132(7), p 2076–2081, 2002.
- GAMBELLI, L., & SANTARONI, G. P. (2004). Polyphenols content in some Italian red wines of different geographical origins. *Journal of Food Composition and Analysis*, v 17, p 613–618, 2004.
- GARCÍA-FALCÓN, M. S., PÉREZ-LAMELA, C., MARTÍNEZ-CARBALLO, E., & SIMAL-GÁNDARA, J.(2007). Determination of phenolic compounds in wines: Influence of bottle storage of young red wines on their evolution. *Food Chemistry*, v 105, p 248–259, 2007.
- GIEHL, M. R.; DAL BOSCO, S. M.; LAFLOR, C. M.; WEBER, B. Eficácia dos flavonóides da uva, vinho tinto e suco de uva tinto na prevenção e no tratamento secundário da aterosclerose. *Scientia Medica*, Porto Alegre, v. 17, n. 3, p. 145-155, 2007.
- GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E. Anthocyanins: characterization and measurement with uv-visible spectroscopy. In: WROLSTAD, R.E. *Current protocols in food analytical chemistry*. New York: John Wiley & Sons, Unit. F, p 12-13, 2001.
- GHISELLI, A., NARDINI, M., BALDI, A., & SCACCINI, C. (1998). Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from italian Red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 46, p 361–367, 1998.

- GOLDBERG, D. M., & NG, E. Regional differences in resveratrol isomer concentration of wines from various cultivars. *Journal of Wine Research*, v 7, p 13–24, 1996.
- GOLLUCKE, A. P.B.; CATHARINO, R.R.; SOUZA, J.C.; EBERLIN, M.N.; TAVAREZ, D.Q. Evolution of major phenolic components and radical scavenging activity of grape juices through concentration process and storage. *Food Chemistry*, v 112, p 868–873, 2009.
- GÓMEZ-ALONSO, S.; GARCÍA-ROMERO, E.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, v 20, p 618–626, 2007.
- GUERRERO R. F.; LIAZID, A.; PALMA, M.; PUERTAS, B.; GONZÁLEZ-BARRIO, R.; GIL-IZQUIERDO, A.; GARCÍA-BARROSO, C.; CANTOS-VILLAR, E. Phenolic characterisation of red grapes autochthonous to Andalusia. *Food Chemistry*, v 112, p 949–955, 2009.
- GÜRBÜZ, O.; GÖÇMEN, D.; DAGDELEN, F.; GÜRSOY, M.; AYDIN, S.; SAHIN, I.; BÜYÜKUYSAL, L.; USTA, M. Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry*, v 100, p 518–525, 2007.
- HÄKKINEN, S.; HEINONEN, M.; KÄRENLAMPI, S.; MYKKÄNEN, H.; RUUSKANEN, J.; TÖRRÖNEN, R. - Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. - *Food Research International*, v 32, p 345-353, 1999.
- HALL III, C.A.; CUPPETT, S.L. Structure-Activities of Natural Antioxidants. In: ARUOMA, O.I.; CUPPETT, S.L., editors. *Antioxidant Methodology In vivo and in vitro Concepts*. Illinois: AOCS PRESS, p 141-172, 1997.
- HAVSTEEN, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, v 96, p 67-202, 2002.
- HAYEK T, FUHRMAN B, VAYA J, et al. Reduced progression of atherosclerosis in polipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols

- quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology*, v 17 p 2744-52, 1997.
- HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Content of potentially anti-carcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the The Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 40, p 2379-2383, 1992.
- HO, P.; HOGG, T.A.; SILVA, M.C.M. - Application of a liquid chromatographic method for the determination of phenolic compounds and furans in fortified wines. - *Food Chemistry*, v 64, p 115-122, 1999.
- HOLLMAN, P.C.H.; VRIES, J.H.M.; VAN LEEUWEN, S.D.; MENGELERS, M.J.B.; KATAN, M.B. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition*, v 62, p 1276-1282, 1995.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 53, p 1.841-1.856, 2005.
- HUNG, L., CHEN, J., HUANG, S., LEE, R., & SU, M. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovascular Research*, v 47(3), p 549–555, 2000.
- 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*, doi:10.1016/j.jfca.2008.03.011, 2008.
- ISHIGE, K.; SCHUBERT, D.; SAGARA, Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biology Medicine*, v 30, p 433-446, 2001.
- JEANDET, P.; BESSIS, R.; MAUME, B. F.; MEUNIER, P.; PEYRON, D.; TROLLAT, P. Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 43, p. 316-319, 1995.

- JUNG, S.K.; LEE, K. W.; BYUN, S.; KANG, N.J.; LIM, S.H.; HEO, Y-S; BODE, A.M.; BOWDEN, T.; LEE, H.J.; DONG, Z. Myricetin Suppresses UVB-Induced Skin Cancer by Targeting Fyn. *Cancer Research*, v 68(14), p 6021–9, 2008.
- KÄHKÖNEN, M. P., & HEINONEN, M. (2003). Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 51, p 628–633.
- KALLITHRAKA, S.; ARVANITOYANNIS, I.; EL-ZAJOULI, A.; KEFALAS, P. - The application of an improved method for trans-resveratrol to determine the origin of Greek red wines. *Food Chemistry*, v 75, p 355–363, 2001.
- KAMEL, B.S.; DAWSON, H. Characteristics and composition of melon and grape seeds oils and cakes. *Journal of American Oil Chemistry Society*, v 62, p 881-883, 1985.
- KANNER, J.; FRANKEL, E.N.; GRANIT, R.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E. Natural Antioxidants in Grapes and Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 42, p 64-69, 1994.
- KATSUBE, N.; KEIKO, I.; TSUSHIDA, T.; YAMAKI, K.; KOBORI, M. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 51, p 68-75, 2003.
- KIM, D.S.; HA, K.C.; KWON, D.Y.; KIM, M.S.; KIM, H.R.; CHAE, S.W.; CHAE, H.J. Kaempferol Protects Ischemia/Reperfusion-Induced Cardiac Damage Through the Regulation of Endoplasmic Reticulum Stress. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, v 30, Issue 2, p 257 – 270, 2008.
- KING, R.E., BOMSER, J.A., MIN, D.B., 2006. Bioactivity of resveratrol *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v 5, p 65–70, 2006.
- KÖHLER, N.; WRAY, V.; WINTERHALTER, P. Preparative isolation of procyanidins from grape seed extracts by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, v 1177, p 114–125, 2008.
- KONG, J.-M., CHIA, L.-S., GOH, N.-K., CHIA, T.-F., & BROUILLARD, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, v 64(5), p 923–933, 2003.

- KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*; v 25, p 726-732, 2005.
- LAGO, E. S.; GOMES, E.; SILVA, R. da. Produção de geleia de jambolão (*Syzygium cumini* Lamarck): processamento, parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v26, p 847-852, 2006.
- LAPIDOT, T.; HAREL, S.; AKIRI, B.; GRANIT, R.; KANNER, J. pH-Dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidantes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 47, p 67-70, 1999.
- LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; ROMERO-PÉREZ, A. I. WATERHOUSE, A.L.; LIORET, M.; DE LA TORRE-BORONAT, M.C. Resveratrol and piceid levels in wine production and in finished wine. Wine nutritional and therapeutic benefits. Washington: American Chemical Society, p. 56-68. (Acs Symposium Series 661), 1997.
- LEE, J.; RENNAKER, C. Antioxidant capacity and stilbene contents of wines produced in the Snake River Valley of Idaho. *Food Chemistry*, v 105, p 195–203, 2007.
- LEVART, A.; VEBER, M.; Determination of aldehydes and ketones in air samples using cryotrapping sampling. *Chemosphere*, v 44, p 701, 2001.
- LIANG, Z. ; WU, B.; FAN, P.; YANG, C.; DUAN W.; ZHENG, X.; LIU, C.; LI, S. Anthocyanin composition and content in grape berry skin in *Vitis* germplasm. *Food Chemistry*, v 111, p 837–844, 2008
- LOPEZ, M.; MARTÍNEZ, F.; DEL VALLE, C.; ORTE, C.; MIRO, M. - Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. - *Journal of Chromatography A*, v 922, p 359–363, 2001.
- LÓPEZ-VÉLEZ, M., MARTINEZ-MARTINEZ, F., & DEL VALLE-RIBES, C. D. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v 43(3), p 233–244, 2003.

- LUIS, D.A. de y ALLER, R. Papel de los flavonoides del té en la protección cardiovascular. *Anais de Medicina Interna (Madrid)*. [online]. vol. 25, no. 3 [citado 2008-09-09], pp. 105-107, 2008,.
- LURTON, L. (2003). Grape polyphenols: a new powerful health ingredients. *Innovations in Food Technology*, v 18, p 28–30, 2003.
- MAKRIS, D.P., KALLITHAKA, S., KEFALAS, P., 2006. Flavonols in grapes, grape products and wine: burden, profile and influential parameters. *Journal of Food Composition and Analysis*, v 19, p 396–404, 2006.
- MALACRIDA, C.R.; MOTTA, S da. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v 25, p 659-664, 2005.
- MAMEDE, M.E.O; PASTORE, G.M. Compostos Fenólicos Do Vinho: Estrutura E Ação Antioxidante. *B.CEPBPA, CURITIBA* v 222, n 2, p 223 – 252, 2004.
- MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of American Oil Society*, v 45, p 594-598, 1968.
- MARTINEZ JAB, RAMOS SG, MEIRELLES MS, VERCEZE AV, ARANTES MR, VANNUCCHI H. Efeitos da quercetina na lesão pulmonar induzida por bleomicina: um estudo preliminar. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v 34(7), p 445-452, 2008.
- MASA A.; VILANOVA, M.; POMAR, F. Varietal differences among the flavonoid profiles of white grape cultivars studied by high- performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v 1164, p 291–297, 2007.
- MASA, M.; VILANOVA, M. Flavonoid and aromatic characterisation of cv. Albarín Blanco (*Vitis vinifera* L.). *Food Chemistry*, v 107, p 273–281, 2007.
- MATEJICEK, D.; MIKES, O.; KLEJDUS B.; STERBOVÁ, D.; KUBÁN, V. Changes in the contents of phenolic compounds during maturing of barrique red wines. *Journal of Food Chemistry*, v 90,p 791 – 800, 2005.
- MAXCHEIX, J. J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. The main phenolics of fruits. In *Fruit Phenolics*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1-98, 1990.
- MCCALLUM,J.L.; YANG,R.; YOUNG, J.C.; STROMMER ,J.N.; TSAO.R. Improved high performance liquid chromatographic separation of anthocyanin compounds from

- grapes using a novel mixed-mode ion-exchange reversed-phase column. *Journal of Chromatography A*, v 1148, p 38–45, 2007.
- MELLO, L. M. R. de. *Vinicultura Brasileira: Panorama 2007*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008. Disponível em: http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/panorama_2007_vitivinicultura.pdf Acessado em: 03/2008.
- MEYER, A.S., HEINONEN, M., FRANKEL, E.N., 1998. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry*, v 61, p 71–75.
- MEZADRI, T.; VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives *Journal of Food Composition and Analysis*, v 21, p 282–290, 2008.
- MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. *Journal of American Oil Society*, v 48, p 91, 1971.
- MOTA, R.V. Caracterização físico-química de geleia de amora preta. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v 26, p 539-543, 2006.
- MORENO-LABANDA, J.; MALLAVIA, R., PEREZ-FONS, L., LIZAMA, V., SAURA, D., & MICOL, V. Determination of piceid and resveratrol in Spanish wines deriving from Monastrell (*Vitis vinifera* L.) grape variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, p 52(17), p 5396–5403, 2004.
- NEIVA, T.J. C., MORAES, A. C. R., BUCHELE, C. *et al.* Antiplatelet activity of *Croton celditifolius*. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas* [online], v 44, n. 1 [cited 2008-09-08], p 127-132, 2008. Available from: <<http://www.scielo.br>
- O'CONNELLA, J.E.; FOXA, P.F. - Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. - *International Dairy Journal*, v 11, p 103–120, 2001.

- OLIVEIRA, R.G. Identificação, quantificação e caracterização antioxidante de flavonóides e vitamina C em geleias de frutas. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil, 2010.
- PEREZ-MAGARIÑO, S.; REVILLA, I.; GONZALEZ-SANJOSE, M.L.; BELTRAN, S. - Various applications of liquid chromatography–mass spectrometry to the analysis of phenolic compounds. - *Journal of Chromatography A*; v 847, p 75–81, 1999.
- PÉREZ-LAMELA, C.; GARCÍA-FALCÓN, M.S.; SIMAL-GÁNDARA, J.; ORRIOLS-FERNÁNDEZ, I. Influence of grape variety, vine system and enological treatments on the colour stability of young red wines. *Food Chemistry*, v 101, p 601–606, 2007.
- PIETTA, P.G. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, v.63, n7, p. 1035 – 1042, 2000.
- PINELO, M.; MONZOCCO, L.; NUÑEZ, M.J.; NICOLI, M.C. Interaction among phenolics in food fortification: negative synergism on antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 52, p 1177-1180, 2004.
- POMMER, C. V.; PASSOS, I. R. S.; TERRA, M. M.; PIRES, E. J. P. Variedades de videira para o Estado de São Paulo. Instituto Agrônômico, Campinas: IAC, 1997. 53 p., Boletim técnico, 166.
- PRUTHI, J.S. Processing of grape juice, juice products and by-products. *Indian Food Packer*, v 25, p 38-44, 1971.
- QUEENSBERRY – A origem das geleias. Disponível em: <http://www.queensberrynews.com.br/> Acesso em: 15/05/2010.
- RAMOS, R.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; PEREIRA, C.; FERREIRA, M. A.; FAIA, M. A. - A preliminary study of non-coloured phenolics in wines of varietal white grapes (côdega; gouveio and malvasia fina): effects of grape variety; grape maturation and technology of winemaking *Food Chemistry*, v 67, p 39-44, 1999.
- REVILLA, E., GARCÍA-BENEYTEZ, E., CABELLO, F., MARTÍN-ORTEGA, G., & RYAN, J.-M. (2001). Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *Journal of Chromatography A*, v 915, p 53–60, 2001.

- RICE-EVANS C.A.; MILLER N.J.; PAGANGA G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, v 2, p 152-159, 1997.
- ROBERTS, W.G.; GORDON, M.H. Determination of the antioxidant activity of fruits and vegetables by a liposome assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 51, p 1486-1493, 2003.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia sequencial de planejamentos, Campinas, SP, Casa do Pão Editora, 2005.
- ROMERO-PÉREZ, A.I.; IBERN-GÓMES, M.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.; TORRE-BORONAT, M.C. Piceid, the major resveratrol derivative in grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 47, p 1533-1536, 1999.
- ROSTAGNO, M.A.; PALMA, M.; & BARROSO, C.G. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, v 1012, p 119 -128, 2003.
- RUBERTO, G.; RENDA, A.; DAQUINO, C.; AMICO, V.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C.; TOMMASI, N. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chemistry*, v 100, p 203–210, 2007.
- SAKKIADI, A.V., STAVRAKAKIS, M.N., HAROUTOUNIAN, S.A., 2001. Direct HPLC assay of five biologically interesting phenolic antioxidants in varietal greek red wines. *Lebensm. Wiss. u. Technology* v 34, p 410–413, 2001.
- SANTOS NETO, J.R. de A.; PEREIRA, F.M.; MARTINS, F.P.; LEITÃO FILHO, H. de F. Características e possibilidades do cultivar de videira IAC 138-22. *O Agrônomo*, Campinas, v 20 (9 – 10), p 1-8, 1968.
- SAURA-CALIXTO, F; GOÑI, I. Definition of the Mediterranean Diet Based on Bioactive Compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.49, p 145-152, 2009.

- SAURA-CALIXTO, Y.; LARRAURI, J. A. Nuevos tipos de fibras dietéticas de alta calidad (New type of high quality dietary fibers). *Alimentos. Equipamentos e Tecnologia*, I, p 71-74, 1996.
- SCHERER, R.; GODOY, Helena T . Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, v 112, p 654-658, 2009.
- SCHIEBER, A.; KELLER, P.; CARLE, R. - Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. - *Journal of Chromatography A*, v 910, p 265–273, 2001.
- SCHRAMM, D.D.; YGERMAN, J.B. Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. *Journal of Nutricional Biochemistry*, v 9, p 560-566, 1998.
- SELLAPPANS, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 50, p 2432-2438, 2002.
- SHAHIDI, F.; NACZK, M. *Food Phenolics: sources, chemistry, effects and applications*. Lancaster: Technomic, p 331, 1995.
- SILVERTSEN, H.K.; HOLE, B.; NICOLAYSEN, F.; RISKVVK, E. – Classification of French red wine according to their geographical origin by the use of multivariate analysis - , *Journal of Science Food Agriculture*, v 79, p 107-115, 1999.
- SIEMANN, E. H., & CREASY, L. L. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, v 43(1), p 49–52, 1992.
- SILVA, F. C. C. da; VIANA, A. P.; SILVA, M. G. O. da. Caracterização química e determinação dos estádios fenológicos de variedades de videiras cultivadas no Norte Fluminense. *Revista Brasileira de Fruticultura* [online], v 30, n 1 [cited 2008-09-10], p. 38-42, 2008. Available from: <<http://www.scielo.br>
- SIMIC, M. G., & JOVANOVIC, S. V. (1994). Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. In C.-T. Ho, T. Osawa, M.-T. Huang, & R. T. Rosen (Eds.), *Food phytochemicals for cancer prevention II – teas, spices, and herbs*. ACS Symposium Series. Washington DC: American Chemical Society, v. 547, p 20–32, 1994.

- SIMOPOULOS, A. P. The Mediterranean Diets: What is so special about the Diet of Greece? The Scientific Evidence. *Journal of Nutrition*, v. 131, p. 3065 – 3073S, 2001.
- SOARES, M; WELTER, L; KUSKOSKI E.M.; GONZAGA, L; FETT,R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.30, n.1, p.59-64, 2008.
- SOLEAS, G. J.; GOLDBERG, D. M.; DIAMANDIS, E. O.; KARUMANCHIRI, A.; YAN, J.; NG, E. A derivatized gas chromatographic-mass spectrometric method for the analysis of both isomers of resveratrol in juice and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 46, n. 3, p. 346-352, 1995.
- SPACIL,Z.; NOVAKOVA,L.; SOLICH, P. Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography. *Talanta*, v 76, p 189–199, 2008.
- STERVBO, U., VANG, O., & BONNESEN, C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chemistry*, v 101(2), p 449–457, 2007.
- SZABO, M.R.; IDITOIU, C; CHAMBRE, D;LUPEA, A.X. Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. *Chemical Papers*, v 61(3), p 204-216, 2007.
- TERRA, M. M. A produção de uvas no Sul do Estado de Minas Gerais. In: Encontro Sul Mineiro De Fruticultura De Clima Temperado, 1.,1996, Poços de Caldas. *Anais Poços de Caldas*: [s.n.], p. 12-22, 1996..
- TSUDA, T; WATANABE, M.; OHSHIMA, K.; NORINOBU, S.; CHOI, S.W.; KAWAKISHI, S., OSAWA, T. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-β-D glucoside and cyanidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 42, p 2407-2410, 1994.
- URPI-SARDA, M., JAUREGUI, O., LAMUELA-RAVENTOS, R. M., JAEGER, W., MIKSITS, M., COVAS, M.-I., ET AL. Uptake of diet resveratrol into the human low-density lipoprotein. Identification and quantification of resveratrol metabolites by

- liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, v 77(10), p 3149–3155, 2005.
- UVIBRA - UNIÃO BRASILEIRA DE VITIVINICULTURA. Produção de Uvas, Elaboração de Vinhos e Derivados. Disponível em: http://www.uvibra.com.br/pdf/safra_uva1998-2009.pdf. Acesso em: 09/05/2010.
- THRELFALL, R. T.; MORRIS, J. R.; MAUROMOUSTAKOS A., Effect of variety, ultraviolet light exposure, and enological methods on the *trans*-resveratrol level of wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 50, n. 1, p. 57-64, 1999.
- VALENTÃO, P.; SEABRA, R.M.; LOPES, G.; SILVA, L.R.; MARTINS, V. RUJILLO, M.E.; VELASQUÉZ, E.; ANDRADE, P.B. Influence of *Dekkera bruxellensis* on the contents of anthocyanins, organic acids and volatile phenols of Dão red wine. *Food Chemistry*, v 100, p 64–70, 2007.
- VALIENTE, C.; ARRIGONI, E.; ESTEBAN, R.M.; AMADO, R. Grape pomace as a potential food fiber. *Journal of Food Science*, v 60, p 818-820, 1995.
- VILLIERS, A., VANHOENACKER, G., MAJEK, P., & SANDRA, P. (2004). Determination of anthocyanins in wine by direct injection liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and classification of wines using discriminant analysis. *Journal of Chromatography A*, v 1054, p 195–204, 2004.
- VIÑAS, P.; AGUINAGA, N.; CAMPILLO, N.; MANUEL HERNÁNDEZ-CÓRDOBA. *Journal of Chromatography A*, v 1194, p 178–183, 2008
- VINSON, J.A.; JANG, J.; YANG, J.; DABBAGH, Y.; LIANG, X.; SERRY, M.; PROCH, J.; CAI, S. Vitamins and especially flavonoids in common beverages are powerful in vitro antioxidants which enrich lower density lipoproteins and increase their oxidative resistance after ex vivo spiking in human plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 47, p 2502-2504, 1999.
- VIRGILI, M., & CONTESTABILE, A. Partial neuroprotection of in vivo excitotoxic brain damage by chronic administration of the red wine antioxidant agent, *trans*-resveratrol in rats. *Neuroscience Letter*, v 281(2–3), p 123–126, 2000.

- VIROT, M.; TOMAO, V.; Le BOURVELLEC, C.; RENARD, C. M.C.G.; CHEMAT, F. Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry* (2009), doi: 10.1016/j.ultsonch.2009.10.015, 2009.
- WALKER, A.R.; LEE, E.; BOGS, J.; MCDAVID, D.A.; THOMAS, M.R.; ROBINSON, S.P.(2007) White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *The Plant Journal*, v 49 (5), p 772–85, 2007.
- WANG, J.; SUN, B.; CAO, Y.; TIAN, Y.; LI, X. Optimization of ultrasounded-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, v 106, p 804-810, 2008.
- WANG, J., MAZZA, G. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 50, p 4183-4189, 2002.
- WANG, L.; & WELLER, C.L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*, v 17, p 300 – 312, 2006.
- WANG, H., CAO, G., & PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 45, p 304–309, 1997.
- WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.E.; RICE-EVANS, C. (2004). Flavonoids antioxidants or signaling molecules? *Free Radical Biology & Medicine*, v 36, p 838-849, 2004.
- YILMAZ, Y., TOLEDO, R.T., 2004. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 52, p 255–260, 2004.
- ZAFRILLA, P., MORILLAS, J., MULERO, J., CAYUELA, J. M., MARTÍNÉZ-CACHÁ, A., PARDO, F., & NICOLÁS, J. M. L. (2003). Changes during storage in conventional and ecological wine: phenolic content and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 51, p 4694–4700, 2003.

**CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO DE
FORMULAÇÃO DE GELEIA DE UVA COM
APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DO
PROCESSAMENTO**

Lucíula Lemos Lima Morelli¹ e Marcelo Alexandre Prado¹

¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6121, 13083-862, Campinas,
SP, Brasil

RESUMO

As geleias, em especial a de uva, são alimentos muito apreciados pela população em geral. Sua produção mundial surgiu no Oriente Médio, com os guerreiros das cruzadas, sendo depois servidas como iguarias pelas rainhas em seus castelos. Atualmente são empregadas para acompanhar pães, como recheios, dentre outras funções. No mundo inteiro, as geleias de uva são fabricadas com diversas variedades da fruta, sendo o processamento básico comum à maioria dos fabricantes, que gera como resíduos cascas e as sementes, que são partes muito ricas em compostos fenólicos antioxidantes. O objetivo desse capítulo da dissertação de mestrado foi desenvolver uma formulação de geleia de uva aproveitando os resíduos da produção, bem como avaliar outra variedade da fruta (IAC-138-22) frente às variedades mais comumente utilizadas no Brasil atualmente (Niágara e Isabel). Por meio de análise do conteúdo de compostos fenólicos totais, por Folin Ciocalteau, chegou-se à conclusão de que a variedade IAC-138-22 apresenta significativamente maior conteúdo de compostos fenólicos totais tanto para a fruta *in natura* (8,619 mg E.A.G./g contra 4,542 mg E.A.G/g), quanto para todas as geleias produzidas com essa variedade, frente à mistura Niágara e Isabel (0% casca: 2,008 mg E.A.G./g versus 0,525 mg E.A.G./g; 3% casca: 5,323 mg E.A.G./g versus 1,439 mg E.A.G./g; 6% casca: 6,533 mg E.A.G./g versus 2,049 mg E.A.G./g).

Palavras - chave: uva, geleia, compostos fenólicos, aproveitamento de resíduos

ABSTRACT

Jams, specially the grape ones, are very appreciated by the world population. Its production arose in the Middle East, within the Warriors of the Crusades, and since that it started being served as delicacies by the queens in their castles. Nowadays, jams are employed to dress breads, as cake fillers, among others. Throughout the world, grape jams are produced with several varieties of the fruit, and the basic process is common to the majority of the factories. This process generates the grape skin and seeds as residues, which are very important parts in concern to antioxidant phenolic compounds. The aim of this work was to develop a grape Jam formulation utilizing the skin residue, as well as evaluating another grape variety (IAC-138-22) compared to the commonly used varieties in Brazil (mixture of Niágara Rosada and Isabel). Through analysis of phenolic content, by Folin Ciocalteau, it is concluded that the variety IAC 138-22 had presented significantly higher phenolic compounds content, both for the fresh fruit (8,619 mg E.A.G./g versus 4,542 mg E.A.G/g) and for all the jams tested, in relation to the blend Niagara Rosada and Isabel (0%skin: 2,008 mg E.A.G./g versus 0,525 mg E.A.G./g; 3% skin: 5,323 mg E.A.G./g versus 1,439 mg E.A.G./g; 6% skin: 6,533 mg E.A.G./g versus 2,049 mg E.A.G./g).

Key words: grape, Jam, phenolic compounds, waste recovery

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção de uvas de mesa representa aproximadamente 85% da produção total de uvas, porém vem cedendo espaço pouco a pouco para a produção de uvas viníferas, desde o ano de 1998 (UVIBRA, 2009). Do total de uvas produzidas em território nacional no ano de 2006, 47% foram destinados à elaboração de vinhos, sucos, geleias e outros derivados (MELLO, 2007).

A geleia de uva é um dos derivados dessa fruta muito aceito pela população mundial, comumente usada para acompanhar pães, bolachas e derivados, sendo ainda empregada em recheios de bolos e artigos de confeitaria (MELLO, 2007). Sua produção mundial surgiu no Oriente Médio, com os guerreiros das cruzadas, voltando para suas casas. Depois começou a ser servida como iguarias pelas rainhas em seus castelos (QUEENSBERRY, 2010).

Os principais ingredientes utilizados para elaborar a geleia são: fruta (*in natura*, em pedaços, suco ou polpa), pectina, ácido cítrico, açúcar e água (ALBUQUERQUE, NACCO e FARO, 1996). Por se tratar de um alimento de processamento relativamente simples, com emprego de ingredientes de baixo custo, alguns autores apontam a geleia como uma alternativa viável para o aproveitamento econômico das frutas *in natura* (ALBUQUERQUE, NACCO e FARO, 1996; LAGO, GOMES e SILVA, 2006). O consumo de produtos derivados de uva tais como geleias, pode apresentar vantagem com relação ao do vinho, já que a ausência de álcool permite que tais produtos sejam consumidos pela maioria das pessoas, inclusive crianças e pessoas portadoras de

doenças, como, por exemplo, a hepatite (ROMERO-PÉREZ et al., 1999; MALACRIDA e MOTTA, 2005).

A Agência de Vigilância Sanitária estabelece que geleia de fruta seja o produto obtido pela cocção de frutas (inteiras ou em pedaços), polpa ou suco de frutas, com açúcar e água e concentrado até consistência gelatinosa. (ANVISA, 1978). O produto não pode ser colorido nem aromatizado artificialmente, sendo tolerada a adição de acidulantes e de pectina, caso necessário, para compensar qualquer deficiência do conteúdo natural de acidez da fruta e/ou de pectina.

As variedades de uva mais comumente utilizadas para a fabricação de geleias no Brasil são as variedades Niágara Rosada e Isabel juntas, que apresentam composições diferentes em relação aos compostos fenólicos, sendo a variedade Isabel mais rica em antocianinas, os pigmentos naturais da uva (SOARES et al., 2008). No estado de São Paulo, atualmente, a produção de uvas da variedade IAC 138-22 (Máximo), que é uma variedade de uvas viníferas, resultante do cruzamento das variedades Siebel e Syrah, está em franca expansão (SANTOS NETO et al., 1968). Essa variedade possui coloração roxa intensa, o que é uma característica muito positiva para a fabricação de geleias. Além do fator sensorial mais atrativo, considera-se o fato do conteúdo de antocianinas, que são flavonóides, estar diretamente relacionado à ação antioxidante, o que pode aumentar essa funcionalidade em geleias.

Um fator contrário ao apelo de geleia de uva como sendo um derivado funcional é que a temperatura de produção, acima de 90°C, diminui sensivelmente o teor de compostos fenólicos provenientes da fruta, mas alguns compostos como as antocianinas,

ainda permanecem em significativas quantidades e podem permanecer estáveis na matriz durante o seu armazenamento (FALCÃO et al., 2007; MOTA, 2006).

A indústria relacionada à uva gera diferentes produtos processados e desses obtém-se subprodutos como cascas e sementes, que constituem o resíduo da industrialização da uva. O material composto principalmente por cascas apresenta efeito vaso relaxante e atividade antioxidante, além de elevados níveis de fibras e polifenóis, sendo essa a fração mais rica em antocianinas e resveratrol do fruto. Sendo assim, é interessante utilizá-lo na elaboração de novos produtos com capacidade de promoção de saúde, ou no enriquecimento de produtos já existentes, como a geleia de uva (BERTAGNOLLI et al., 2007; RUBERTO et al., 2007; LURTON, 2003; KATSUBE et al., 2003; KONG et al., 2003; KÄHKÖNEN & HEINONEN, 2003; KALLITHRAKA et al., 2001; FRANKEL, 1999; GHISELLI et al., 1998; LAMUELA RAVENTOS et al., 1997; WANG, CAO, & PRIOR, 1997; RICE-EVANS, MILLER & PAGANGA, 1997; SAURA-CALIXTO e LARRAURI, 1996; SOLEAS et al., 1995; JEANDET et al., 1991; SIMIC & JOVANOVIC, 1994; FITZPATRICK, HIRCHFIELD e COFFEY, 1993).

Apesar de todos os compostos benéficos presentes nas cascas de uva, que as tornam interessantes como um ingrediente adicional em geleias, um fator negativo de sua adição durante o processamento em derivados é que os ácidos graxos insaturados presentes na casca podem gerar “gostos herbáceos”, por meio de diversas reações de oxidação enzimática, que resultam em álcoois e aldeídos. Durante a fermentação, esses aldeídos poderão ser transformados em seus respectivos álcoois, com sabores mais

toleráveis (AZEVEDO et al., 2007; ESCUDERO et al., 2002; LEVART & VEBER, 2001; ZEA et al., 2001).

De posse dessas informações, o objetivo desse capítulo da dissertação de mestrado foi desenvolver uma formulação de geleia empregando a variedade de uva IAC 138-22 e compará-la à formulação convencional de geleia, com as uvas Niágara Rosada e Isabel, além de também empregar cascas residuais da prensagem dos bagos da fruta, no intuito de aumentar a resposta *in vitro* do conteúdo de compostos fenólicos totais do produto.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes

O etanol e metanol utilizados foram da marca J.T.Baker, grau cromatográfico, o clorofórmio foi da marca Alkimia, grau P.A. e a água utilizada foi purificada por meio do sistema Direct-Q 3 UV (Millipore Corporation, France). O reagente Folin Ciocalteu foi adquirido da marca Fukla.

2.2. Produção de geleia

Foram utilizadas uvas das variedades Niágara e Isabel para produzir as formulações tradicionais, que foram adquiridas no CEASA – Campinas. Também foi utilizada a variedade IAC 138-22 (Máximo), adquirida com produtor de Campinas (São Paulo, Brasil).

As formulações de geleias foram delineadas de acordo com os padrões da ANVISA para geleias - extra, ou seja, 60 partes de fruta para 50 partes de açúcar. As

três formulações se diferenciaram pelo conteúdo de cascas secas a elas adicionadas. Essas cascas foram provenientes do resíduo após a prensagem dos bagos de uva para retirada da polpa. Depois da separação, elas foram secas em secador de ar forçado, com vazão de 3m/s, a 50°C, por 3 horas. Assim as sementes se separaram da casca mais facilmente, antes de irem para o triturador para facilitar a homogeneização na geleia. Foram produzidas 6 formulações diferentes. As 3 primeiras formulações utilizaram uma mistura de 90% da variedade Isabel e 10% da variedade Niágara. As 3 últimas foram produzidas com 100% da variedade IAC 138-22. A formulação F1 não foi adicionada de casca (0%), a formulação F2 foi acrescida de 3% em massa de casca e a formulação F3 teve acréscimo de 6% em massa de cascas. Apesar de terem sido produzidas com variedades diferentes, as formulações F1, F2 e F3 são iguais para ambas as geleias. Cada uma das formulações foi produzida em triplicata para avaliar a repetitividade entre elas. A **TABELA 2.1** mostra como foram feitas as formulações utilizadas para esse estudo.

TABELA 2.1. Formulações de geleia de uva para estudo do conteúdo de fenólicos totais.

Ingrediente	90% Isabel/10% Niágara			IAC 138-22		
	F1 (Kg)	F2 (kg)	F3 (kg)	F1 (Kg)	F2 (kg)	F3 (kg)
Polpa	6	6	6	6	6	6
Sacarose	4	4	4	4	4	4
Pectina	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Casca Seca	-	0,300	0,610	-	0,305	0,730
Massa Total (início)	10,15 ± 0,12	10,45 ± 0,29	10,76 ±0,36	10,15 ± 0,25	10,46 ± 0,25	10,88 ± 0,25
Massa Total (final)	7,83 ± 0,23	6,79 ± 0,24	6,99 ± 0,38	7,79 ± 0,31	7,78 ± 0,37	8,00 ± 0,36

A **figura 2.1** mostra o fluxograma de produção utilizado para esse estudo. Para as formulações que empregam cascas secas, estas foram adicionadas logo após a homogeneização da solução de pectina.

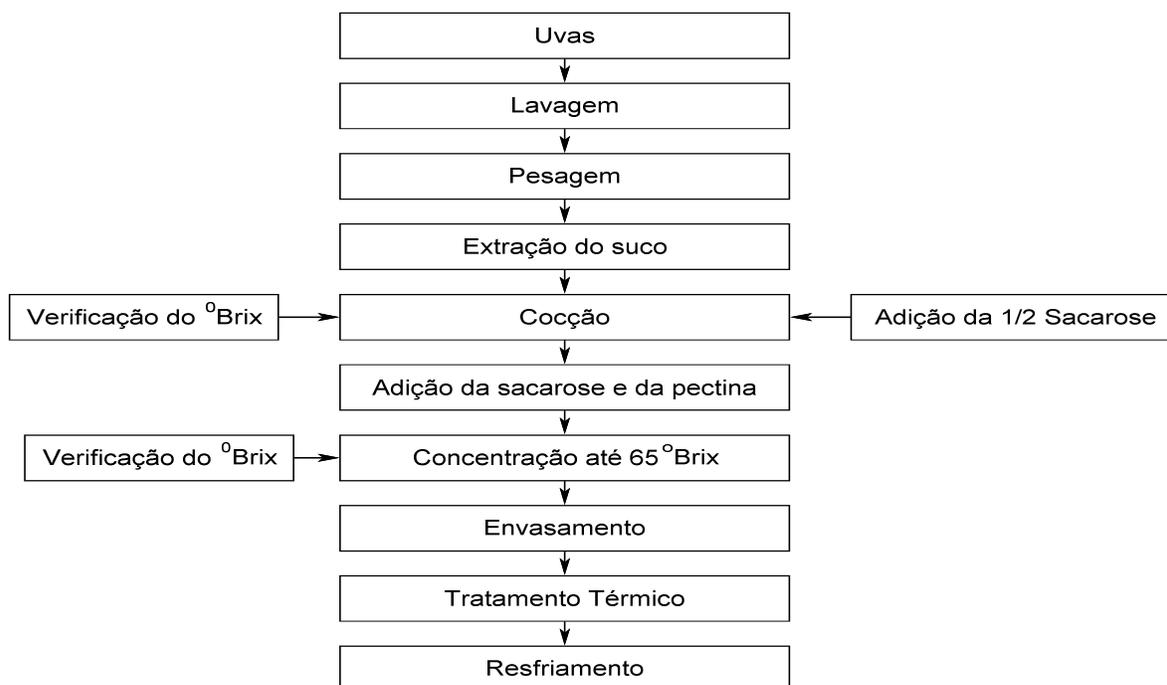


Figura 2.1. Fluxograma de produção de geleia utilizado para a confecção das formulações de estudo.

2.3. Extração de Compostos Fenólicos de uvas e de geleias

O método utilizado para extração foi o mesmo descrito por SCHERER & GODOY (2009). Foram pesadas alíquotas de 20,0 g de amostras, as quais foram dissolvidas em 100 ml de metanol e então submetidas à agitação por 180 min. Esta solução foi filtrada e o resíduo ressuspensionado em 100 mL de metanol e submetido novamente à agitação por uma hora. Após nova filtração, os extratos foram juntados em

uma única solução e evaporados a 38°C, até secura total. A amostra foi ressuspensa em 50 ml de metanol no ato da análise. Este método será otimizado no **capítulo 3** desta dissertação.

2.4. Avaliação de compostos fenólicos totais por Folin Ciocalteu

O método utilizado para determinação do teor compostos fenólicos totais foi o Folin-Ciocalteu (SINGLETON, ORTHOFER & LAMUELA-RAVENTOS, 1999). O procedimento consiste nos seguintes passos: uma alíquota de 500 µL de amostra foi adicionada a 6 mL de reagente Folin Ciocalteu, diluído a 10% em água destilada, em tubo de ensaio. Após agitação aguardou-se 5 minutos e adicionou-se 2,5 mL de solução de carbonato de sódio 7,5% (m/v), agitando-se novamente. Os tubos foram deixados por duas horas a temperatura ambiente para reagir e depois as soluções foram analisadas em comprimento de onda de 740 nm. As análises foram realizadas nas uvas *in natura* e nas geleias produzidas com a mistura Isabel e Niágara Rosada e com as geleias produzidas com a variedade IAC 138-22. Foi utilizado ácido gálico como padrão e os resultados foram expressos em equivalente em ácido gálico (mg E.A.G./g de amostra).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Produção de Geleias

A massa de casca de uva empregada nas formulações F2 (3% do valor da massa de açúcar e polpa somados) refere-se à quantidade total de casca proveniente da quantidade de uvas utilizadas para extração de polpa destinada à fabricação de geleia. Esse valor tem

origem no fato da casca hidratada corresponder a aproximadamente 27% da massa de uva para todas as variedades, e quando seca passar a corresponder a 3% do mesmo total.

Para o caso das formulações F3, o intuito foi avaliar se o dobro da quantidade de casca conferiria um aumento linear na resposta de compostos fenólicos presentes na geleia.

A primeira medição dos graus Brix, com o intuito de monitorar o processo, foi realizada na polpa para fabricação de geleia, que em média foi de 14,3 +/- 0,5 °Brix. A segunda após a adição da primeira metade da sacarose, sendo, depois disso, essa medida utilizada como um fator de monitoramento durante o processo. Ao atingir o valor de 65 °Brix, o processo de cocção era interrompido e as geleias eram armazenadas (**TABELA 2.2**).

Outra medição importante foi o pH da polpa e das geleias prontas, com o objetivo de verificar se haveria necessidade de diminuí-lo com a adição de ácido cítrico, caso a polpa apresentasse pH maior que 3,5. Essa necessidade vem do fato de que a pectina é menos eficiente na formação de géis a pHs superiores. A **TABELA 2.2** mostra os valores dessas medidas.

TABELA 2.2. Medidas de °Brix e pH da polpa e das formulações de geleias:

	90% Isabel/10% Niágara		IAC 138-22	
	pH	°Brix	pH	°Brix
Polpa	3,30 ± 0,09	12,9 ± 0,1	2,7 ± 0,12	14,3 ± 0,5
Formulação F1	3,30 ± 0,10	65,0 ± 1,12	2,75 ± 0,07	63 ± 1, 53
Formulação F2	3,30 ± 0,15	65,0 ± 1,30	2,82 ± 0,08	65 ± 1,0
Formulação F3	3,30 ± 0,21	65,0 ± 1,05	2,8 ± 0,10	64,7 ± 0,6

3.2. Avaliação de Compostos Fenólicos Totais por Folin Ciocalteu

A comparação entre as uvas e as geleias foi feita por meio da análise de compostos fenólicos totais, utilizando o reagente Folin Ciocalteu. Para os resultados, uma curva padrão de ácido gálico foi construída, conforme mostra a **figura 2.2**, e os valores de compostos fenólicos totais obtidos para as uvas e geleias estão expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg E.A.G/g amostra).

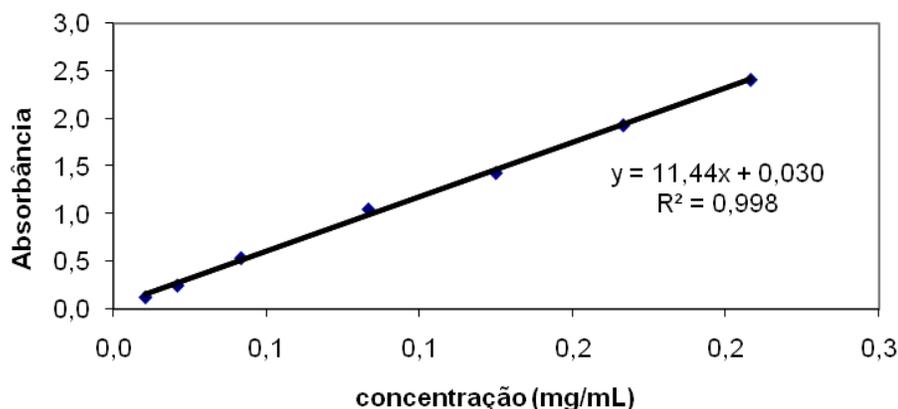


Figura 2.2. Curva padrão de ácido gálico para análise do conteúdo de compostos fenólicos totais.

Os valores obtidos para as duas variedades de uvas, bem como geleias feitas com a mistura Niágara Rosada e Isabel, além das produzidas com IAC 138-22 estão mostrados nas **TABELAS 2.3, 2.4 e 2.5**. Também nessas tabelas se encontram os valores de desvio padrão relativo (DPR), que mostra a dispersão entre os resultados das replicatas de produção e análise das geleias. Os resultados estão expressos em base seca devido ao fato de que a concentração dos compostos nas frutas frescas é menor do que nas geleias.

TABELA 2.3. Resultados obtidos do conteúdo de fenólicos totais, em base seca, para a mistura entre as variedades de uva Niágara e Isabel em comparação com a variedade IAC 138-22.

	Fenólicos Totais (mg E.A.G./g amostra)	Desvio Padrão	DPR (%)
Niágara Rosada + Isabel	4,542 ^a	0,022	6,54
IAC 138-22	8,619 ^b	0,044	5,93

^{a,b}: resultados apresentam diferenças significativas entre si a $p < 0,05$.

TABELA 2.4. Resultados obtidos do conteúdo de fenólicos totais, em base seca, para as para as geleias produzidas com a mistura entre as variedades Niágara e Isabel (90% Niágara + 10% Isabel).

		Fenólicos Totais (mg E.A.G./g amostra)	Desvio Padrão	DPR (%)
Niágara Rosada + Isabel	F1*	0,525 ^a	0,036	10,27
	F2**	1,4394 ^b	0,1419	16,39
	F3***	2,0485 ^c	0,2741	12,65

^{a,b,c}: resultados apresentam diferenças significativas entre si a $p < 0,05$.

*= geleia de uva produzida sem adição de cascas secas;

**=geleia de uva produzida com adição de 3% em massa de cascas de uva secas;

***= geleia de uva produzida com adição de 6% em massa de cascas de uva secas

TABELA 2.5. Resultados obtidos do conteúdo de fenólicos totais, em base seca, para as para as geleias produzidas com a variedade IAC 138-22.

		Fenólicos Totais (mg E.A.G./g amostra)	Desvio Padrão	DPR (%)
IAC 138-22	F1*	2,008 ^a	0,09	10,74
	F2**	5,232 ^b	0,16	7,78
	F3***	6,533 ^c	0,19	6,96

^{a,b,c}: resultados apresentam diferenças significativas entre si a $p < 0,05$.

*= geleia de uva produzida sem adição de cascas secas;

**=geleia de uva produzida com adição de 3% em massa de cascas de uva secas;

***= geleia de uva produzida com adição de 6% em massa de cascas de uva secas

Ao se analisar os valores obtidos, estes apontam que a variedade IAC 138-22 possui, aproximadamente, 53% a mais de compostos fenólicos que a mistura das variedades Niágara Rosada e Isabel, tradicionalmente utilizadas para fabricação de geleias. As geleias feitas com as variedades tradicionais comprovam que quando se parte de matérias-primas com quantidades inferiores do analito de interesse, os derivados certamente apresentarão quantidades inferiores em relação aos produtos que utilizaram matérias-primas mais ricas. Houve aumento médio de 300% no conteúdo de fenólicos totais entre as formulações que empregaram a mistura 90% Niágara Rosada e 10% Isabel para as que utilizaram IAC 138-22, segundo análise por Folin Ciocalteu. Sendo assim, optou-se por trocar a variedade de uva para conferir maior teor de fenólicos às geleias.

No que tange às diferentes formulações de geleias, notou-se que a adição de casca à formulação promoveu aumento no conteúdo de fenólicos totais de aproximadamente 170% de F1 para F2, produzidas com a mistura entre as variáveis Niágara Rosada e Isabel, e de 150% quando se compara as mesmas formulações para a variedade IAC 138-22. Também, quando se dobrou a quantidade de casca, o aumento de F3 em relação à F2 proporcionou diferença significativa no teor de fenólicos em relação às duas formulações. Para as geleias produzidas com a mistura entre as variáveis Niágara Rosada e Isabel, o aumento de F3 em relação a F2 foi de 42%. Já para as formulações IAC 138-22, o aumento foi de somente 24%. Esse dado desestimula um maior aumento da quantidade de casca como apelo funcional ao produto, já que as cascas deixam a textura da geleia mais arenosa.

Um dado importante observado é que, independente das variedades utilizadas nos processamentos, a perda de compostos fenólicos durante a cocção é muito significativa, chegando a representar 76% para a formulação sem casca feita com a variedade IAC 138-22. Por outro lado, esses dados também mostram a importância da adição das cascas nas formulações, pois mesmo essas sendo secas a 50°C antes de serem submetidas ao processo de cocção, ainda conservam grande parte de seus fenólicos, o que as torna capazes de suavizar a perda durante o processamento de geleia. Pode-se explicar a resistência desses compostos ao calor quando presentes na casca devido ao efeito protetor exercido pelas fibras presentes nas mesmas. De acordo com NACZK & SHAHIDI (2004) existem os fenólicos insolúveis, que estão ligados covalentemente à parede celular de vegetais, sendo esses mais difíceis de serem extraídos da casca que os solúveis, que estão mais livres em vacúolos celulares. Adicionando-se 3% de casca a perda em relação à fruta fresca foi de 39,3% e quando se adicionou 6% de casca esses valores diminuíram para 24%.

4. CONCLUSÃO

A variedade IAC-138-22 contém significativamente mais compostos fenólicos que a mistura Niágara Rosada e Isabel, tanto em relação às matérias-primas quanto em relação aos derivados, no caso as respectivas geleias. Além disso, ao se adicionar casca de uva à formulação de geleia, houve aumento significativo no conteúdo de compostos fenólicos no produto, que chegou a ficar somente 24,20% inferior ao conteúdo nas frutas frescas. Porém, ao dobrar a quantidade de casca o aumento de compostos fenólicos não se

dobrou, embora tenha aumentado significativamente, o que desencorajou a tentativa de se adicionar mais casca em detrimento da textura do produto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, J. P.; NACCO, R.; FARO, A. Avaliação global de geleias de uva por meio do método de dados difusos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 16, 250-254, 1996.
- ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Gerência-Geral Alimentos. Resolução - CNNPA nº 12, de 1978, D.O. de 24/07/1978. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_78.pdf. Acessado em: 03/08.
- AZEVEDO, L. C. de, REIS, M. M., SILVA, L. A. da et al. Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. *Química Nova* [online]. v 30, n 8 [cited 2008-09-11], p 1968-1975. Available from: <<http://www.scielo.br>, 2007
- BERTAGNOLLI, S. M. M., ROSSATO, S. B., SILVA, V.L. et al. Influence of the carbonic maceration on the levels of trans-resveratrol in cabernet sauvignon wine. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas* [online], v 43, n. 1 [cited 2008-09-10], p 71-77. Available from: <<http://www.scielo.br>, 2007.
- FALCÃO, A. P.; CHAVES, E. S.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R.; FALCÃO, L. D.; BORDIGNON – LUIZ, M. T. Índice de polifenóis, antocianinas totais e atividade antioxidante de um sistema modelo de geleia de uvas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* [online], v 27, n.3 [cited 2009-11-19], p 637-642, 2007 .
- FITZPATRICK, D.F.; HIRSCHFIELD S.L.; COFFEY, R.G. Endothelium-dependent vaso-relaxing activity of wine and other products. *American Journal de Physiology*, v 265, p 774-778, 1993.

- FRANKEL, E. N (1999). Food antioxidants and phytochemicals. Present and future perspectives. *Fett Wissenschaft Technologie/Fat Science Technology*, v 101(12), p 450–455, 1999.
- GHISELLI, A., NARDINI, M., BALDI, A., & SCACCINI, C. (1998). Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from Italian Red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 46, p 361–367, 1998.
- JEANDET, P.; BESSIS, R.; MAUME, B. F.; MEUNIER, P.; PEYRON, D.; TROLLAT, P. Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 43, p. 316-319, 1995.
- KÄHKÖNEN, M. P., & HEINONEN, M. (2003). Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 51, p 628–633, 2003.
- KALLITHRAKA, S.; ARVANITTOYANNIS, I.; EL-ZAJOULI, A.; KEFALAS, P. - The application of an improved method for trans-resveratrol to determine the origin of Greek red wines. *-Food Chemistry*, v 75, p 355–363, 2001.
- KATSUBE, N.; KEIKO, I.; TSUSHIDA, T.; YAMAKI, K.; KOBORI, M. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 51, p 68-75, 2003.
- KONG, J.-M., CHIA, L.-S., GOH, N.-K., CHIA, T.-F., & BROUILLARD, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, v 64(5), p 923–933, 2003.
- LAGO, E. S.; GOMES, E.; SILVA, R. da. Produção de geleia de jambolão (*Syzygium cumini* Lamarck): processamento, parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial. *Ciência Tecnologia de Alimentos*. Campinas, v 26, p 847-852, 2006.
- LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; ROMERO-PÉREZ, A. I. et al. Resveratrol and piceid levels in wine production and in finished wine. Wine nutritional and therapeutic benefits. Washington: American Chemical Society, p. 56-68. (Acs Symposium Series 661), 1997.

- LEVART, A.; VEBER, M.; Determination of aldehydes and ketones in air samples using cryotrapping sampling. *Chemosphere*, v 44, p 701, 2001.
- LURTON, L. (2003). Grape polyphenols: a new powerful health ingredients. *Innovations in Food Technology*, v 18, p 28–30, 2003.
- MALACRIDA, C.R.; MOTTA, S da. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v 25, p 659-664, 2005.
- MELLO, L. M. R. de. *Vinicultura Brasileira: Panorama 2007*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008. Disponível em:
http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/panorama2007_vitivinicultura.pdf.
Acessado em: 03/2008.
- MOTA, R.V. Caracterização físico-química de geleia de amora preta. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v 26, p 539-543, 2006.
- NACZK, M; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, v 1054, p 95-111, 2004.
- QUEENSBERRY – A origem das geleias. Disponível em:
<http://www.queensberrynews.com.br/> Acesso em: 15/05/2010.
- RICE-EVANS C.A.; MILLER N.J.; PAGANGA G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* , v 2, p 152-159, 1997.
- ROMERO-PÉREZ, A.I.; IBERN-GÓMES, M.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.; TORRE-BORONAT, M.C. Piceid, the major resveratrol derivative in grape juice. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v 47, p 1533-1536, 1999.
- RUBERTO, G.; RENDA, A.; DAQUINO, C.; AMICO, V.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C.; TOMMASI, N. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chemistry*, v 100, p 203–210, 2007.
- SANTOS NETO, J.R. de A.; PEREIRA, F.M.; MARTINS, F.P.; LEITÃO FILHO, H. de F. Características e possibilidades do cultivar de videira IAC 138-22. *O Agrônomo*, Campinas, 20 v (9 – 10), p 1-8, 1968.

- SAURA-CALIXTO, Y.; LARRAURI, J. A. Nuevos tipos de fibras dietéticas de alta calidad (New type of high quality dietary fibers). *Alimentos e Equipamentos Tecnológicos*, I, p 71-74, 1996.
- SCHERER, R.; GODOY, Helena T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, v 112, p 654-658, 2009.
- SIMIC, M. G., & JOVANOVIĆ, S. V. (1994). Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. In C.-T. Ho, T. Osawa, M.-T. Huang, & R. T. Rosen (Eds.), *Food phytochemicals for cancer prevention II – teas, spices, and herbs*. ACS Symposium Series - Washington DC: American Chemical Society, v 547, p 20-32, 1994.
- SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; & LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, v 299, p 152-178, 1999.
- SOLEAS, G. J.; GOLDBERG, D. M.; DIAMANDIS, E. O.; KARUMANCHIRI, A.; YAN, J.; NG, E. A derivatized gas chromatographic-mass spectrometric method for the analysis of both isomers of resveratrol in juice and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 46, n. 3, p. 346-352, 1995.
- SOARES, M; WELTER, L; KUSKOSKI, E.M.; GONZAGA, L; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.30, n.1, p.59-64, 2008.
- UVIBRA - UNIÃO BRASILEIRA DE VITIVINICULTURA. Produção de Uvas, Elaboração de Vinhos e Derivados. Disponível em: http://www.uvibra.com.br/pdf/safra_uva1998-2009.pdf. Acesso em: 09/05/2010.
- WANG, H., CAO, G., & PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 45, p 304–309, 1997.

**CAPÍTULO 3: OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO POR
ULTRA-SOM DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM
GELEIAS DE UVA PRODUZIDAS COM A
VARIEDADE IAC-138-22 (MÁXIMO)**

Lucíula Lemos Lima Morelli¹ e Marcelo Alexandre Prado¹

¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6121, 13083-862, Campinas,
SP, Brasil

RESUMO

As geleias, em especial a de uva, são alimentos muito apreciados pela população mundial. Por se tratar de um derivado, cuja matéria prima é uma excelente fonte de compostos fenólicos antioxidantes, o objetivo dessa dissertação foi otimizar a extração desses compostos utilizando o sistema de ultra-som. Os compostos fenólicos antioxidantes foram extraídos e posteriormente analisados por meio da determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais (Folin Ciocalteu), e a atividade antioxidante por meio de emprego do radical livre DPPH• e do sistema beta caroteno/ ácido linoléico. Para determinar a melhor combinação entre concentração de solvente, tempo e temperatura de extração, os experimentos foram executados utilizando o método de delineamento composto central rotacional (DCCR). Por meio da metodologia de superfície de resposta (RSM) chegou-se à melhor combinação entre os fatores dentro do intervalo estudado, que foram etanol a 60% em água, 50 °C por 20 minutos. Os parâmetros otimizados para esse método foram comparados à uma extração comumente utilizada na literatura, que costumava ser o método padrão de extração e os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de quercetina/ g de geleia. O novo método permitiu aumento de 70% no potencial antioxidante medido por DPPH• e de 65% medido pelo sistema beta caroteno/ ácido linoléico. Além disso, houve um decréscimo significativo do tempo total de análise para esse estudo (10 horas para 3 horas), quando comparado com o método padrão.

Palavras-chave: geleia de uva, compostos fenólicos, potencial antioxidante, análise multivariada, extração por ultra-som.

ABSTRACT

Jam and Jellies, specially the grapes ones, are largely appreciated by the world population, since they use them breads and cookies dressing, as cake covers and fillers. Because grape jam is a derivative from an excellent source of phenolic compounds such as grape, the aim of this work was to perform an extraction for antioxidant phenolic compounds in red grape jam utilizing an ultrasound assisted system. The antioxidant phenolic compounds were extracted and then analyzed through the determination of total phenolic content (Folin Ciocalteu), and the antioxidant activity by the free radical DPPH• and through the beta carotene/linoleic acid system. To determine the best combination among solvent concentration, time and temperature of extraction, the experiments were carried out utilizing the central composite rotatable design (CCRD) method. Through the response surface methodology (RSM) the best combinations were 60% ethanol: water, 50°C and 20 minutes. The optimized parameters for this method were compared to an extraction method commonly used at literature, that used to be the standard method, and the results were expressed in milligrams of quercetin equivalents/ g of jam. The new method allowed an increase of 70% in the result of antioxidant potential measured by DPPH• and 65% when measured by beta carotene/linoleic acid system. Besides that, there has been a significant decrease of the total time analysis of the study (10 hours to 3 hours) when compared to the standard method.

Key words: grape jam, phenolic compounds, antioxidant potential, multivariate analysis, ultrasound assisted extraction.

1. INTRODUÇÃO

Entre as frutas, a uva é uma das maiores fontes de compostos fenólicos, especialmente os flavonóides e antocianinas, que mostram uma grande capacidade para captar radicais livres causadores do chamado estresse oxidativo, auxiliando na prevenção de enfermidades cardiovasculares, circulatórias, cancerígenas e neurológicas (IACOPINI et al., 2008; KATSUBE et al., 2003; WANG & MAZZA, 2002; ISHIGE, SCHUBERT & SAGARA, 2001; LAPIDOT et al., 1999; SCHRAMM & YGERMAN, 1998; TSUDA et al., 1994; ABE et al., 2007; FRANCIS, 2000). Nos últimos anos, o crescimento no interesse em antioxidantes naturais e seu papel na saúde e nutrição humanas tem sido notório. Em estudos sobre o efeito dos flavonóides na saúde relata-se que a administração dos mesmos na dieta fez com que houvesse redução drástica da oxidação induzida do colesterol LDL nos indivíduos sob estresse oxidativo, além de proporcionar melhoria nas respostas antiinflamatórias (HAYEK et al., 1997; GIEHL et al., 2007; MARTINEZ et al., 2008).

Para as uvas, a síntese de resveratrol é principalmente iniciada na casca e é ausente ou em baixíssima concentração na polpa da fruta. Na vinificação de uvas tintas, a maceração com cascas e sementes durante a fermentação é o principal fator pelos altos níveis de resveratrol nos vinhos tintos, quando comparados a vinhos brancos. A extração do resveratrol da casca pode ser facilitada com o etanol produzido durante o processo de fermentação (BERTAGNOLLI *et al* 2007; KALLITHRAKA et al., 2001; THRELFALL, MORRIS & MAUROMOUSTAKOS , 1999; LAMUELA-RAVENTOS, *et al*, 1997; SOLEAS et al., 1995; JEANDET et al., 1995). Assim, as cascas, comumente tidas como

resíduos da indústria podem ser contribuintes benéficos quando adicionados aos produtos.

O consumo de produtos derivados de uva tais como geleias, também se mostram eficazes na prevenção de doenças, já que boa parte dos compostos fenólicos das uvas é mantida nesses produtos. Os derivados de uva constituem uma alternativa viável ao aproveitamento econômico das frutas, agregando valor ao produto e disponibilizando seus constituintes benéficos ao longo de todo o ano (ALBUQUERQUE, NACCO & FARO, 1996; LAGO, GOMES & SILVA, 2006). Nesse contexto, geleias de uva podem apresentar vantagem com relação ao vinho, já que a ausência de álcool permite que tais produtos sejam consumidos pela maioria das pessoas, inclusive crianças e pessoas portadoras de doenças, como, por exemplo, a hepatite (ROMERO-PÉREZ et al., 1999; MALACRIDA & MOTTA, 2005).

Os principais ingredientes utilizados para elaborar a geleia são: fruta (*in natura*, em pedaços, suco ou polpa), pectina, ácido cítrico e açúcar (ANVISA, 1978). Há estudos que demonstram que apesar do processamento da fruta na forma de geleia reduzir a quantidade de antocianinas, ainda pode-se encontrar elevados teores delas, mesmo após armazenamento à presença de luz (FALCÃO et al, 2007; MOTA, 2006; ALBUQUERQUE, NACCO & FARO, 1996).

As variedades de uva mais comumente utilizadas para a fabricação de geleias no Brasil são as variedades Niágara Rosada e Isabel. Porém, para este capítulo da dissertação de mestrado, as geleias foram fabricadas com uvas da variedade IAC 138-22 (Máximo), que é uma variedade de uvas viníferas produzidas atualmente no estado de

São Paulo, resultante do cruzamento das variedades Siebel e Syrah, com teor de antocianinas total visualmente superior às demais, além de capacidade antioxidante também superior (SANTOS NETO et al., 1968).

A extração de compostos fenólicos antioxidantes é comumente utilizada para estudos com plantas (SCHERER & GODOY, 2009) e há desenvolvimento de novos métodos ambientalmente corretos, com técnicas que promovem decréscimo do consumo de solventes e aumento no rendimento de extratos (WANG et al., 2008; WANG & WELLER, 2006). Dentre essas técnicas está a extração por ultra-som, como sendo uma alternativa simples, eficiente e economicamente vantajosa. O ganho na extração obtida com utilização do equipamento de ultra-som é atribuído principalmente aos efeitos de cavitações acústicas produzidas no solvente devido à passagem da onda ultra-sônica. O ultra-som também exerce um efeito mecânico, permitindo melhor penetração do solvente na amostra, o que aumenta a superfície de contato e melhora a difusibilidade do soluto para o meio (WANG et al., 2008; VIROT et al., 2009; ROSTAGNO, PALMA & BARROSO, 2003).

No presente estudo, os parâmetros utilizados na extração por ultra-som foram a concentração de solvente, a temperatura e o tempo de extração, sendo esses otimizados por meio da utilização da metodologia de superfície de resposta, empregando delineamento composto central rotacional com três variáveis, em dois níveis, com o objetivo de obter as melhores condições de compostos fenólicos antioxidantes em geleia de uva.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostras

As uvas da variedade IAC-138-22, empregadas na fabricação das geleias, foram obtidas de produtores da região de Campinas. As geleias foram fabricadas com os seguintes ingredientes: uva, açúcar refinado, açúcar invertido e pectina, em uma composição de 60 partes de polpa de uva para 40 partes de açúcar. A casca de uva foi secada em secador por ar forçado a 3m/s e 50°C, por 3 horas. Depois essas cascas foram trituradas e incorporadas à geleia durante a fabricação, correspondendo a 6% da massa de polpa de uva adicionada. A produção foi realizada em tacho encamisado, não ultrapassando 90°C.

2.2. Reagentes

O etanol e metanol utilizados foram da marca J.T.Baker, grau cromatográfico, o clorofórmio é da marca Alkimia, grau P.A. e a água utilizada foi purificada por meio do sistema Direct-Q 3 UV (Millipore Corporation, France). O reagente Folin Ciocautau foi adquirido da marca Fukla. Os reagentes DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), beta-caroteno, ácido linoléico e Tween 20 foram fornecidos pela Sigma-Aldrich do Brasil.

2.3. Extração de compostos fenólicos antioxidantes por ultra-som

A extração por ultra-som foi feita em um banho de ultra-som (Ultra Cleaning 1400, 40 khz, 80W, Unique Ind e Com. Ltda, Brasil). As amostras (10 g) foram acondicionadas em erlenmeyers de 125 mL, com 100 mL do solvente de extração, e submetidas ao ultra-som por diferentes tempos e temperaturas, conforme requereu o

planejamento experimental. A temperatura foi controlada por meio de um termostato inserido no banho de ultra-som, a intensidade constante. Após a extração, as amostras foram retiradas do banho resfriadas com água fria e filtradas a vácuo, utilizando filtro de papel Whatman nº 1. As soluções foram recolhidas e transferidas para um balão volumétrico de 100 mL. Essa solução foi utilizada para a determinação do conteúdo de fenólicos totais, do potencial antioxidante pelo radical livre DPPH• e pelo sistema Beta caroteno/ ácido linoléico.

2.4. Determinação de Compostos Fenólicos Totais

O método utilizado para determinação de compostos fenólicos totais foi o Folin-Ciocalteu (SINGLETON, ORTHOFER & LAMUELA-RAVENTOS, 1999). O método consiste nos seguintes passos: uma alíquota de 500 µL de amostra foi adicionada a 6 mL de reagente Folin Ciocalteu, diluído a 10% em água destilada, em tubo de ensaio. Após agitação aguardou-se 5 minutos e adicionou-se 2,5 mL de solução de carbonato de sódio 7,5% (m/v), agitando-se novamente. Os tubos foram deixados por duas horas à temperatura ambiente para reagir e depois as soluções foram transferidas para cubetas para medir a absorbância, em comprimento de onda de 740 nm. Todo o procedimento foi realizado na ausência de luz. Foi utilizado quercetina como padrão e os resultados foram expressos em equivalente em quercetina (mg E.Q./g de geleia).

2.5. Determinação da Capacidade Antioxidante pelo radical livre DPPH•

A atividade antioxidante foi determinada por dois métodos, sendo um deles o método que demonstra a capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras em

reduzir o radical livre DPPH• (HUANG, OU & PRIOR, 2005). Esse radical livre é um radical orgânico muito estável, de coloração violeta intenso. Quando há redução, a intensidade de sua coloração diminui.

Foi preparada uma solução de DPPH• a 0,039 mg/mL (SCHERER & GODOY, 2009), de forma a apresentar absorvância em 517 nm ao redor de 1,000. As determinações foram realizadas adicionando-se em cada tubo de ensaio 3,9 mL da solução de DPPH• e 100 µL de extrato da amostra, ou o mesmo volume da solução utilizada para extrair as amostras, com o objetivo de se obter uma solução controle. As leituras das absorvâncias foram realizadas após 90 minutos de reação a temperatura ambiente, na ausência de luz. As análises foram realizadas em triplicatas.

O decaimento da absorvância das amostras (A) foi correlacionado ao decaimento da absorvância do controle (C), resultando na porcentagem de inibição do radical livre DPPH• (I DPPH), que pode ser expressa por meio da **Equação 3.1**:

$$IDPPH(\%) = \frac{(C - A) * 100}{C} \text{ (Eq. 3.1)}$$

A curva de calibração foi preparada com 45, 90, 136, 181, 227 mg.K⁻¹ de quercetina por litro e os resultados foram expressos em equivalente em quercetina (mg E.Q./g de geleia).

2.6. Determinação da Capacidade Antioxidante pelo sistema Beta-caroteno/ Ácido linoléico

Esse método foi baseado no trabalho descrito por DASTMALCHI et al. (2008). Para o preparo da mistura reativa, adicionou-se 20 µL de ácido linoléico, 200 mg de

Tween 20, 1 mg de β -caroteno, previamente diluído em 5 mL de clorofórmio, sendo tudo colocado em um balão redondo próprio para evaporação a baixa pressão e inserido em rota-evaporador. A esta mistura isenta de clorofórmio, adicionou-se 50 mL de água destilada e agitou-se vigorosamente.

Após o preparo da mistura, adicionou-se 6 mL dela em cada tubo contendo 50 μ L do extrato de geleia e de solução de etanol a 50% para o controle. Após o preparo, mediu-se a absorvância (Abs 0) de todos os tubos, que sempre ficaram entre 0,600 e 0,700, em comprimento 470 nm.

Os tubos foram incubados em banho-maria a 50°C por 2 horas, para acelerar as reações de oxidação e iniciar o descoramento do β -caroteno. As análises foram realizadas em triplicatas e assim como os padrões de quercetina, as amostras foram diluídas para assegurar que as leituras estivessem na faixa linear da curva padrão. As curvas foram preparadas com 45, 90, 136, 181, 227 mg.K⁻¹ de quercetina.

Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da oxidação (AAI), que foi calculada em relação ao decaimento da absorvância do controle com a queda da absorvância das amostras (Aam) por meio da **Equação 3.2**:

$$AAI(\%) = \left(1 - \frac{(Abs_0 - Abs_{120})_{amostra}}{(Abs_0 - Abs_{120})_{controle}}\right) * 100 \quad \text{(Eq.3.2)}$$

Os resultados foram expressos em equivalente em quercetina (mg E.Q./g de geleia).

2.7. Delineamento experimental

Foi aplicado um delineamento central rotacional (DCCR) com três variáveis em dois níveis, incluindo seis pontos axiais e quatro repetições no ponto central,

totalizando 18 extrações (RODRIGUES, M. I.; IEMMA, 2005). As variáveis X_i foram codificadas como x_i , de acordo com a **Equação 3**:

$$x_i = \frac{(X_i - \bar{X}_m)}{\Delta X_i} \quad (\text{Eq. 3.3}),$$

onde x_i é o valor codificado, X_i é o valor real, \bar{X}_m é o valor real da variável no ponto central e ΔX_i é a diferença entre os passos codificados. As variáveis codificadas e seus níveis, bem como os valores reais utilizados nesse estudo, estão listados na **TABELA 2.1**. A **TABELA 2.2** lista os parâmetros experimentais correspondentes a cada ensaio do planejamento. Foram realizadas triplicatas para cada experimento e a respectiva média foi colocada nas colunas Y de resposta. Por meio dos resultados obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão e construir a equação que melhor se ajusta ao modelo estudado, como a seguir:

$$Y = B_0 + B_1x_1 + B_2x_2 + B_{12} x_1x_2 + B_{11} x_1^2 + B_{22}x_2^2 + e \quad (\text{Eq.3.4})$$

Onde os valores das variáveis B_0 , B_1 , B_2 , B_{12} , B_{11} e $B_{22}x_2^2$ são os valores gerados do cálculo dos coeficientes de regressão. Para encontrar os coeficientes de regressão utilizou-se o software STATISTICA 7.0 e a porcentagem de variação explicada foi expressa pelo coeficiente de determinação R^2 , a 5% e a 10 % de significância estatística.

2.8. Definição das variáveis do processo

Para se iniciar o delineamento experimental, escolheram-se como pontos centrais os valores antes utilizados quando se trabalhava com a extração proposta na literatura. Para o tempo de extração, o ponto central foi baseado em outros estudos

feitos com ultra-som para diferentes matrizes (WANG et al., 2008; VIORT et al., 2009; ROSTAGNO, PALMA & BARROSO, 2003). Dessa forma, para otimizar o processo de extração, escolheram-se como condições centrais do DCCR etanol a 60% (v/v), temperatura de extração de 50 °C e tempo de 20 minutos.

TABELA 3.1 - Variáveis independentes e os valores utilizados na otimização do processo de extração.

Variáveis Independentes		Níveis				
		- α	-1	0	+1	+ α
		(-1,68)				(+1,68)
Concentração de etanol (%)	x1	43	50	60	70	77
Temperatura de Extração (°C)	x2	33	40	50	60	67
Tempo (min)	x3	11	15	20	25	29

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados de compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante por DPPH• e pelo sistema beta caroteno/ ácido linoléico foram baseados nas investigações dos efeitos das concentrações de etanol, temperatura e tempo de extração dos compostos fenólicos antioxidantes em geleia de uva, sendo essas as variáveis do delineamento experimental.

A **TABELA 3.2** mostra os resultados da extração de acordo com o delineamento fatorial.

TABELA 3.2: Parâmetros Experimentais do modelo e Y resposta para os testes de conteúdo de compostos fenólicos totais (Y1), potencial antioxidante por DPPH• (Y2) e por Beta caroteno/ácido linoléico (Y3):

Ensaio	Etanol (%)	Temperatura (*C)	Tempo (min)	Fenólicos Totais (mg E.Q./g geleia*)	I DPPH (mg E.Q./g geleia*)	AAI (mg E.Q./g geleia*)
1	-1 (50)	-1 (40)	-1 (15)	46,45	3,12	3,64
2	1 (70)	-1 (40)	-1 (15)	31,22	1,83	2,18
3	-1 (50)	1 (60)	-1 (15)	52,54	2,67	5,15
4	1 (70)	1 (60)	-1 (15)	40,98	2,57	5,40
5	-1 (50)	-1 (40)	1 (25)	49,67	3,14	5,66
6	1 (70)	-1 (40)	1 (25)	35,76	2,03	5,40
7	-1 (50)	1 (60)	1 (25)	53,95	2,92	5,36
8	1 (70)	1 (60)	1 (25)	39,95	1,97	5,42
9	-1,68 (43)	0 (50)	0 (20)	50,31	3,52	5,27
10	1,68 (77)	0 (50)	0 (20)	38,51	3,04	3,35
11	0 (60)	-1,68 (33)	0 (20)	42,41	2,53	4,22
12	0 (60)	1,68 (67)	0 (20)	49,93	2,46	5,33
13	0 (60)	0 (50)	-1,68 (11)	45,76	3,63	5,46
14	0 (60)	0 (50)	1,68 (29)	50,01	3,77	4,93
15	0 (60)	0 (50)	0 (20)	47,87	4,08	5,92
16	0 (60)	0 (50)	0 (20)	48,26	4,05	5,88
17	0 (60)	0 (50)	0 (20)	47,48	4,00	5,81
18	0 (60)	0 (50)	0 (20)	48,28	3,96	5,84

* mg E.Q/ g geleia = miligramas equivalentes em quercetina por gramas de geleia

O maior valor encontrado para o conteúdo de fenólicos totais (53,95 mg Q.E./g geleia) foi obtido sob os parâmetros de concentração de etanol a 50%, temperatura de extração a 60°C, durante 25 minutos. Para a capacidade antioxidante por meio do radical livre DPPH•, o maior valor obtido (4,08 mg E.Q/ g geleia) encontra-se nas condições centrais do delineamento experimental. Por último, a ação antioxidante pelo sistema beta caroteno/ácido linoléico também se mostrou melhor (5,92 mg E.Q/ g

geleia) nas condições centrais. Sabe-se de outros estudos (ANGELO & JORGE, 2007; HE, LIU & LIU, 2008) que o método de determinação do conteúdo de fenólicos totais não é um método específico, por determinar além dos compostos fenólicos antioxidantes, substâncias redutoras presentes no alimento, que podem interferir nos resultados. Por esse motivo, além do fato de que somente o perfil do delineamento para essa variável dependente difere das outras, só foram considerados os dois métodos de determinação da capacidade antioxidante na discussão dos resultados.

As análises estatísticas revelam que a variável mais relevante ($p < 0,05$), tanto para o método por DPPH• quanto para o método pelo sistema betacaroteno/ ácido linoléico ($p < 0,10$) é a temperatura (**TABELA 3.3**). Para o caso do método por DPPH•, as altas concentrações de etanol (70%) foram responsáveis pelos menores valores de inibição do radical livre DPPH• (1,83 mg E.Q./ g geleia). Para o caso do sistema beta caroteno/ ácido linoléico, altas concentrações de etanol (acima de 65%) combinadas com menores tempos de extração (ao redor de 15 minutos) conferem os menores valores (2,18 – 3,35 mg E.Q/ g geleia). Os ensaios a 25 minutos, quando comparados com os realizados em 15 minutos de extração, para o método com beta caroteno/ ácido linoléico, mostrou que o aumento de tempo da extração poderia implicar também em um aumento da capacidade antioxidante por esse método. O mesmo efeito não foi observado pelos resultados com DPPH•.

Foi realizada uma análise de regressão múltipla nos dados experimentais e os coeficientes do modelo foram avaliados em relação às suas significâncias. Para o caso do método por DPPH• os coeficientes significativos foram etanol quadrático e

temperatura linear e quadrática. O coeficiente de determinação do modelo foi de 0,845, o que indica que o modelo representa adequadamente a relação entre os parâmetros escolhidos. Apesar de haver parâmetros não significativos do modelo, pelo fato de estar se utilizando o modelo real, não se descarta nenhum dos coeficientes para construir a equação para a inibição de DPPH• (I DPPH), que é dada a seguir:

$$I \text{ DPPH} = -26,8760 + 0,3829E - 0,0039E^2 + 0,5926T - 0,0067T^2 + 0,5561t - 0,0095t^2 + 0,0017 ET - 0,0017 Et - 0,0015 Tt \quad (\text{Eq. 3.5})$$

A tabela ANOVA (**TABELA 3.3**) mostra que é possível traçar as superfícies de resposta para esse delineamento experimental. Apesar do valor de F calculado mostrar que a falta de ajuste não tende a zero, quando comparado com o valor de F tabelado, nota-se que o erro puro entre as medidas dos pontos centrais é muito pequeno, o que resulta em um valor muito alto no momento da divisão. Nesse caso é possível considerar que a falta de ajuste tende a zero e é possível traçar as superfícies de resposta.

TABELA 3.3. ANOVA para o delineamento feito com resposta por meio do método por DPPH•

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F calc	F tab
Regressão	8,125054	9	0,902784	4,846048	3,39
Resíduo	1,490342	8	0,186293		
Falta de ajuste	1,482	5	0,2963	102,0538	9,01
Erro Puro	0,009	3	0,0029		
Total	9,615	17			

$R^2=0,85$

A mesma análise foi feita para o método pelo sistema beta caroteno/ácido linoléico. Os coeficientes significativos foram etanol quadrático, temperatura linear e quadrática, tempo linear e a interação tempo e temperatura ($p < 0,1$). O coeficiente de determinação do modelo foi de 0,8122, o que também indica adequada correlação do modelo com os resultados experimentais para os parâmetros escolhidos. A **equação 3.6** representa o modelo real para a ação antioxidante (AAI) utilizando esse método:

$$\text{AAI} = -29,3425 + 0,4247 E - 0,0053 E^2 + 0,5099 T - 0,0037 T^2 + 0,8909 t - 0,0087 t^2 + 0,0025 ET + 0,0025 Et - 0,00125 Tt \quad (\text{Eq.3.6})$$

A Tabela ANOVA (**TABELA 3.4**) para as análises feitas com Beta-caroteno/ ácido linoléico indica que é possível traçar as superfícies de resposta para a equação 3.6, seguindo o mesmo motivo explicado para o teste de DPPH•.

TABELA 3.4. ANOVA para o delineamento feito com resposta por meio da análise feita pelo sistema beta caroteno/ ácido linoléico.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F calc	F tab
Regressão	14,260324	9	1,584480427	3,843262	3,39
Resíduo	3,298199	8	0,412274857		
Falta de ajuste	3,292	5	0,6584	327,7271	9,01
Erro Puro	0,006	3	0,0020		
Total	17,559	17			

$R^2 = 0,81$

Para determinar os níveis otimizados das variáveis para a extração de compostos fenólicos da geleia de uva, foram construídas superfícies tridimensionais de resposta, de acordo com as equações 3.5 e 3.6. A **FIGURA 3.1** mostra o efeito da concentração de etanol e a temperatura tanto para a inibição do DPPH•, quanto para a preservação do beta-caroteno. Para o método de DPPH•, a extração se mostrou melhor para

temperaturas entre 40 e 60 °C, desde que a concentração de etanol esteja abaixo de 65%. Para o método de beta caroteno/ácido linoleico, a extração se mostrou pior quando se utilizou concentrações acima de 65% de etanol a temperaturas abaixo de 50 °C.

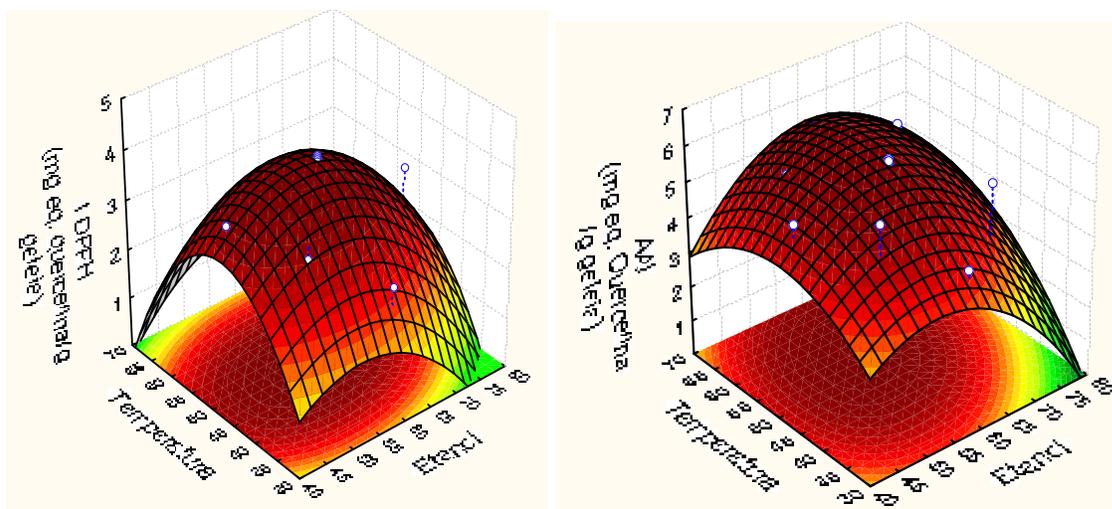


FIGURA 3.1: Efeito da concentração de etanol e da temperatura para a inibição do DPPH• (a) e para a preservação do beta-caroteno (b).

O efeito da concentração de etanol pelo tempo de extração, mostrado na **FIGURA 3.2**, demonstrou que a concentração de etanol para ambos os métodos foi mais significativa que o tempo de extração, devendo esta estar entre 45 e 60% tanto para o método DPPH• quanto para o método beta caroteno/ ácido linoléico.

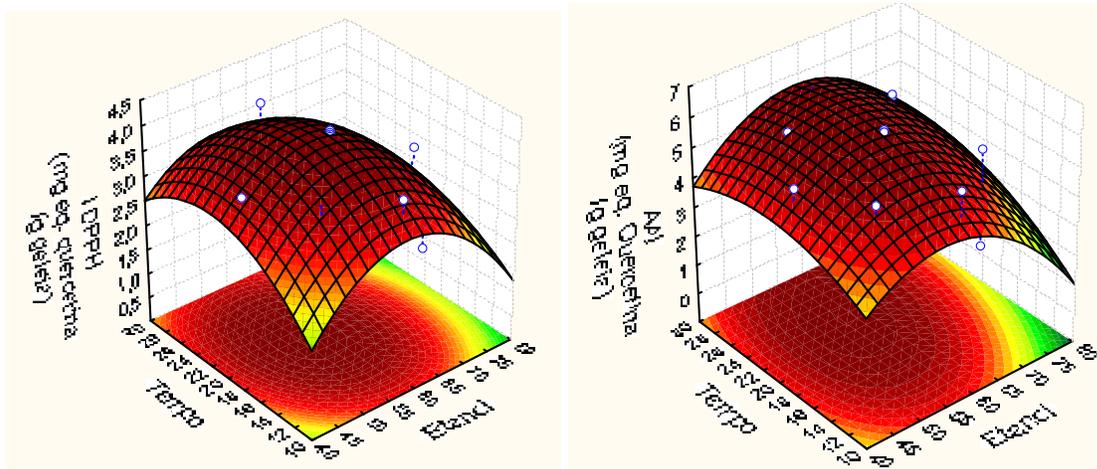


FIGURA 3.2: Efeito da concentração de etanol pelo tempo de extração para a inibição do DPPH• (a) e para a preservação do beta-caroteno (b).

A **FIGURA 3.3** ilustra o efeito da temperatura pelo tempo de extração em ambos os métodos. Para o método por DPPH•, a temperatura deve estar entre 40 e 60 °C, independente do tempo de extração. Já para o método pelo sistema beta caroteno/ ácido linoléico, existe uma faixa de extração, que se encontra nos tempos abaixo de 18 minutos, combinados a temperaturas abaixo de 45 °C, em que a extração é menos eficiente que as demais.

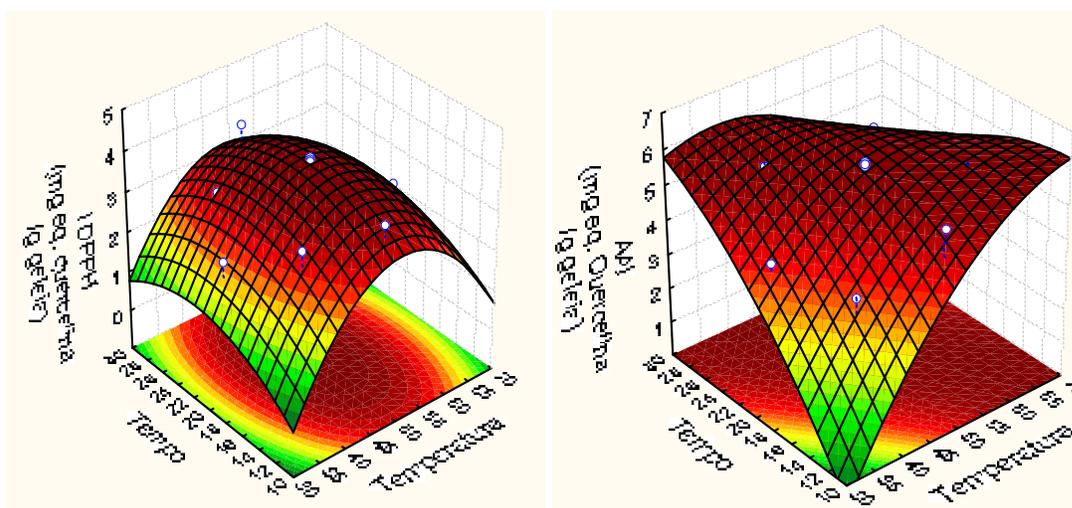


FIGURA 3.3: Efeito da temperatura pelo tempo de extração para a inibição do DPPH• (a) e para a preservação do beta-caroteno (b).

Por meio dos resultados obtidos e utilizando o modelo, chegou-se à conclusão de que a melhor combinação para os parâmetros estão nas condições centrais: 60% de etanol, a 50 °C e 20 minutos. De acordo com essas condições ótimas, colocando os valores nas equações de cada método, a resposta máxima obtida para o método com DPPH• seria de 4,053 mg E.Q./ g geleia e para o sistema beta caroteno/ ácido linoléico seria de 5,860 mg E.Q./ g geleia. Para comparar o resultado predito pelo modelo com o resultado real, foi feita uma validação, repetindo a extração e os métodos antioxidantes com os parâmetros otimizados. Os valores médios foram obtidos em triplicata para o método DPPH• e para o sistema beta caroteno/ ácido linoléico. Para o primeiro, a média obtida foi de $4,219 \pm 0,098358$. Para o último método, a média foi de $5,667 \pm 0,587$

A boa correlação entre os resultados obtidos confirmam que o modelo de superfície de resposta é adequado para ilustrar a otimização dos parâmetros (**TABELA 3.5**).

TABELA 3.5: Comparação entre os resultados obtidos por meio da equação do modelo experimental e na prática, além do valor obtido utilizando o método padrão.

Condições Ótimas			I DPPH (mg E.Q./g geleia)			AAI (mg E.Q./ g geleia)		
Etanol (%)	T (°C)	Tempo (min)	Método Padrão	Predito	Experimental	Método Padrão	Predito	Experimental
60	50	20	2,39		4,219	3,416		5,667
			±	4,053	±	±	5,860	±
			0,12		0,09	0,22		0,587

Há muitos métodos consolidados na literatura para extração de compostos fenólicos em matrizes alimentícias. Dentre eles, o método utilizado por SCHERER & GODOY (2009), em que eles o utilizam para plantas, foi o método utilizado como método padrão de comparação entre os resultados obtidos no delineamento experimental, visto que é um método muito utilizado na literatura para extração de compostos fenólicos em vegetais. Esse método utilizou alíquotas de 20,0 g de amostra e aproximadamente 200 mL de metanol, com evaporação a baixa pressão até *secura total*, para serem ressuspensas somente no momento da análise.

De acordo com os resultados observados para o método DPPH•, houve um aumento de 70% na extração de compostos fenólicos na geleia de uva. Para o sistema beta caroteno/ ácido linoléico o aumento foi de 65%. Além do aumento na eficácia de extração, houve significativa diminuição do tempo de extração e análise, que no método padrão foi de aproximadamente 10 horas, devido ao fato da grande quantidade de açúcar presente na geleia impedir a total secagem do extrato. Esses valores indicam que a aplicação de ultra-som e temperatura para a extração dos compostos fenólicos antioxidantes em geleia de uva pode diminuir muito o tempo de extração, com resultados muito eficazes. Ao se utilizar o novo método, os tempos totais de extração e análise não ultrapassaram 3 horas. A eficiência do ultra-som já foi explicada por outros autores (WANG et al., 2008; VIROT et al., 2009; ROSTAGNO, PALMA & BARROSO,2003), que trabalharam com outros tipos de alimentos e também concluíram que a extração por ultra-som consiste em um método mais rápido e eficaz. Outros resultados que também vale a pena mencionar é a substituição por menor

volume de um solvente menos agressivo, 60 mL etanol, enquanto que no método padrão de extração antes utilizado, empregava-se metanol em uma quantidade de 250 mL no total, resultando, portanto, numa diminuição significativa de geração de resíduos e dos custos de realização da análise.

4. CONCLUSÕES

A utilização do equipamento de ultra-som se mostrou extremamente eficaz para a extração dos compostos em estudo, dentro dos parâmetros avaliados. Além disso, a metodologia de superfície de resposta utilizada na extração se mostrou um excelente método para aumentar a eficácia da extração com a otimização das variáveis do processo, que são a concentração de etanol a 60%, a temperatura de extração a 50 °C e o tempo de 20 minutos. A variável temperatura foi a que apresentou impacto mais significativo na capacidade antioxidante dos extratos, seguida pela concentração de etanol. O tempo de extração foi o que apresentou o menor impacto, sendo necessária a utilização deste acima de 18 minutos. Houve aumento significativo da capacidade antioxidante, nos extratos obtidos pelo sistema de ultra-som, avaliados tanto por DPPH• (aumento de 70%) quanto pelo método de beta caroteno / ácido linoléico (aumento de 65%) em relação ao método padrão utilizado. O presente estudo indica também que a geleia de uva feita com uvas da variedade IAC 138-22 pode ser considerada boa fonte de compostos fenólicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, L. T.; DA MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis lambrusca* L. e *Vitis vinífera* L. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v 27, p 394-400, 2007.
- ALBUQUERQUE, J. P.; NACCO, R.; FARO, A. Avaliação global de geleias de uva por meio do método de dados difusos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v 16, p 250-254, 1996.
- ANGELO, P. M. ; JORGE, Neuza . Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 66, p. 232-240, 2007.
- BERTAGNOLLI, S. M. M., ROSSATO, S. B., SILVA, V.L. *et al.* Influence of the carbonic maceration on the levels of trans-resveratrol in cabernet sauvignon wine. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* [online], v. 43, n 1 [cited 2008-09-10], pp. 71-77, 2007. Available from: <http://www.scielo.br>.
- DASTMALCHI, K.; DORMAN, H.J.D.; OINONEN, P.P.; DARWIS, Y.; LAAKSO, I.; HILTUNEN, R. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *LWT* 41, p 391 – 400, 2008. Available on line at <http://www.sciencedirect.com>.
- FALCÃO, A. P.; CHAVES, E. S.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R.; FALCÃO, L. D.; BORDIGNON – LUIZ, M. T. Índice de polifenóis, antocianinas totais e atividade antioxidante de um sistema modelo de geleia de uvas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* [online], v27, n.3, p. 637-642, 2007.
- FRANCIS, F.J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. *Cereal Food World*, v 45, p 208-213, 2000.
- GIEHL, M. R.; DAL BOSCO, S. M.; LAFLOR, C. M.; WEBER, B. Eficácia dos flavonóides da uva, vinho tinto e suco de uva tinto na prevenção e no tratamento secundário da aterosclerose. *Scientia Medica*, Porto Alegre, v. 17, n. 3, p. 145-155, 2007.
- HAYEK T, FUHRMAN B, VAYA J, ET AL. Reduced progression of atherosclerosis in polipoprotein e-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols

- quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler thromb vasc biol.* v17, p 2744-52, 1997.
- HE, X.; LIU, D.; LIU, R.H. Sodium Borohydride/Chloranil-Based Assay for Quantifying Total Flavonoids. *Journal of Agriculture & Food Chemistry.* v 56, p 9337 – 9334, 2008.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, v 53, p 1.841-1.856, 2005.
- IACOPINI, P., et al., Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: content, in vitro, antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*, DOI:10.1016/J. JFCA.2008.03.011, 2008.
- ISHIGE, K.; SCHUBERT, D.; SAGARA, Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biology Medicine*, v 30, p 433-446, 2001.
- JEANDET, P.; BESSIS, R.; MAUME, B. F.; MEUNIER, P.; PEYRON, D.; TROLLAT, P. Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, v. 43, p. 316-319, 1995.
- KALLITHRAKA, S.; ARVANITOYANNIS, I.; EL-ZAJOULI, A.; KEFALAS, P. - The application of an improved method for trans-resveratrol to determine the origin of Greek red wines. *Food Chemistry*, v 75, p 355–363, 2001.
- KATSUBE, N.; KEIKO, I.; TSUSHIDA, T.; YAMAKI, K.; KOBORI, M. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, v 51, p 68-75, 2003.
- LAGO, E. S.; GOMES, E.; SILVA, R. da. Produção de geleia de jambolão (*Syzygium cumini* Lamarck): processamento, parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v 26, p 847-852, 2006.
- LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; ROMERO-PÉREZ, A. I. *et al.* Resveratrol and piceid levels in wine production and in finished wine. Wine nutritional and therapeutic benefits. Washington: American Chemical Society, p. 56-68. (Acs Symposium Series 661), 1997.

- LAPIDOT, T.; HAREL, S.; AKIRI, B.; GRANIT, R.; KANNER, J. pH-Dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, v 47, p 67-70, 1999.
- MALACRIDA, C.R.; MOTTA, S da. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v 25, p 659-664, 2005.
- MARTINEZ JAB, RAMOS SG, MEIRELLES MS, VERCEZE AV, ARANTES MR, VANNUCCHI, H . Efeitos da Quercetina na Lesão Pulmonar Induzida por Bleomicina: Um Estudo Preliminar. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v 34(7) p 445-452, 2008.
- MOTA, R.V. Caracterização físico-química de geleia de amora preta. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v 26, p 539-543, 2006.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A.F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia sequencial de planejamentos. Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.
- ROMERO-PÉREZ, A.I.; IBERN-GÓMES, M.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.; TORRE-BORONAT, M.C. Piceid, the major resveratrol derivative in grape juice. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, v 47, p 1533-1536, 1999.
- ROSTAGNO, M.A.; PALMA, M.; & BARROSO, C.G. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, v 1012, p 119 -128, 2003.
- SANTOS NETO, J.R. de A.; PEREIRA, F.M.; MARTINS, F.P.; LEITÃO FILHO, H. de F. Características e possibilidades do cultivar de videira IAC 138-22. *O Agrônomo*, Campinas, v 20 (9 – 10), p 1-8, 1968.
- SCHERER, R; GODOY, Helena T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112, 654-658, 2009.
- SCHRAMM, D.D.; YGERMAN, J.B. Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. *Journal of Nutrition & Biochemistry*, v 9, p 560-566, 1998.

- SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.;& LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, v 299, p 152-178, 1999.
- SOLEAS, G. J.; GOLDBERG, D. M.; DIAMANDIS, E. O.; KARUMANCHIRI, A.; YAN, J.; NG, E. A derivatized gas chromatographic-mass spectrometric method for the analysis of both isomers of resveratrol in juice and wine. *American Journal of Enology & Viticulture.*, v. 46, n. 3, p. 346-352, 1995.
- THRELFALL, R. T.; MORRIS, J. R.; MAUROMOUSTAKOS A., Effect of variety, ultraviolet light exposure, and enological methods on the *trans*-resveratrol level of wine. *American Journal of Enology & Viticulture.*, v. 50, n. 1, p. 57-64, 1999.
- TSUDA, T; WATANABE, M.; OHSHIMA, K.; NORINOBU, S.; CHOI, S.W.; KAWAKISHI, S., OSAWA, T. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O- β -D glucoside and cyanidin. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, v 42, p 2407-2410, 1994.
- VIROT, M.;TOMAO, V.; Le BOURVELLEC, C.; RENARD,C. M.C.G.; CHEMAT, F. Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry* (2009), doi: 10.1016/j.ultsonch.2009.10.015., 2009
- WANG, J., MAZZA, G. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, v 50, p 4183-4189, 2002.
- WANG, J.; SUN, B.; CAO, Y.; TIAN, Y.; LI, X. Optimization of ultrasounded-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, v 106, p 804-810, 2008.
- WANG,L.; & WELLER, C.L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*, v 17, p 300 – 312, 2006.

**CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA
ADIÇÃO DE CASCA DE UVA NA FORMULAÇÃO
DE GELEIAS EM RELAÇÃO AO SEU POTENCIAL
ANTIOXIDANTE**

Luciula Lemos Lima Morelli¹, Marcelo Alexandre Prado¹

**Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6121, 13083-862, Campinas,
SP, Brasil.**

RESUMO

A geleia de uva, mesmo após sua fabricação, que emprega altas temperaturas, ainda conserva a forte coloração roxa proveniente das antocianinas presentes nas cascas do fruto. Esses compostos, juntamente com outros compostos fenólicos que podem estar presentes no alimento, conferem à uva *in natura* ação antioxidante elevada, também contribuindo com benefícios à saúde humana. Tais compostos variam em quantidade e tipos, dependendo de várias características exógenas e também da variedade da uva em questão. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial antioxidante *in vitro* de três formulações diferentes de geleias de uva produzidas com a variedade IAC-138-22 (Máximo), utilizando as cascas residuais do processo com intuito de aumentar esse potencial. As técnicas colorimétricas utilizadas foram a análise por meio do radical livre DPPH•, por meio do sistema beta caroteno/ ácido linoléico, por meio do método FRAP de redução do íon ferro e avaliação do conteúdo de antocianinas totais. Assim, observando os resultados obtidos, fica evidente que a adição de cascas à formulação favorece significativamente o aumento do potencial antioxidante por meio de todos os métodos analisados.

Palavras-chave: geleia de uva, compostos fenólicos, potencial antioxidante, métodos colorimétricos

ABSTRACT

Grape Jam, even after its production, which employs high temperatures, still remains strong purple color, which comes from the anthocyanins in grape skins. Those compounds, among other phenolic compounds that may be present in the fruit, promote high antioxidant action to fresh grapes and also contribute with benefits for human health. In addition, those compounds vary in quantity and types, depending on several exogenous characteristics and also on each grape variety. The purpose of this work was to evaluate the *in vitro* antioxidant potential of three formulations of grape Jam, all produced with the variety IAC 138-22, differing by the quantity of dried grape skins added to the formulation, aiming to increase their potential. The colorimetric techniques used were the analyses through the free radical DPPH•, through the beta-carotene/linoleic acid system, through the FRAP method of the iron reduction and through the evaluation of the total anthocyanins content. Therefore, observing the results, it is clear that the addition of dried skin grapes to the formulation favors significantly the increase of the antioxidant potential through all the methods employed.

Keywords: grape jam, phenolic compounds, antioxidant potential, colorimetric methods

1. INTRODUÇÃO

As condições climáticas favoráveis para a produção de uvas no Rio Grande do Sul fez com que a quantidade total de uvas para processamento aumentasse em 35%, em 2007, em relação ao ano anterior, enquanto as uvas destinadas ao consumo *in natura* apresentaram decréscimo (MELLO, 2007). Esse dado evidencia a relevância da pesquisa voltada para produtos processados e seus resíduos. Uma alternativa viável para o aproveitamento econômico das frutas *in natura* é o processamento, por exemplo, na forma de geleias, que agrega valor ao produto e, quando comparada ao vinho, pode ser consumida por maior parcela da população, tais como crianças e portadores de doenças (LAGO, GOMES e SILVA, 2006; MALACRIDA e MOTTA, 2005; ROMERO-PÉREZ et al., 1999; ALBUQUERQUE, NACCO e FARO, 1996). Esse produto também pode ter função de melhoria nas condições de geração de renda dos pequenos produtores de uva (EMBRAPA, 2010), por meio de desenvolvimento de novas formulações, com variedades diferentes, acrescentando apelos de alimentos funcionais, visto que há inúmeros compostos benéficos à saúde nas uvas.

A geleia de uva, mesmo após sua fabricação, que emprega altas temperaturas, ainda conserva a forte coloração roxa proveniente das antocianinas presentes nas cascas do fruto. Esses compostos, juntamente com outros compostos fenólicos que podem estar presentes no alimento em questão, conferem à uva *in natura* ação antioxidante elevada, também contribuindo com benefícios à saúde humana. Tais compostos variam em quantidade e tipos, dependendo de inúmeras características exógenas e também da variedade da uva em questão. Em seu estudo com geleia de ameixa preta, MOTA (2006)

relata que o processamento na forma de geleia reduz o teor de antocianinas, porém o produto pode ser considerado como fonte deste composto devido aos elevados teores observados, mesmo após três meses de armazenamento na presença de luz e temperatura média de 20 °C. FALCÃO et al. (2007) relatam que o processamento, não altera significativamente a quantidade de antocianinas totais e que a temperatura de extração das antocianinas acima de 70 °C auxilia na sua transferência para o mosto que é utilizado para a fabricação de geleia.

Há trabalhos que relacionam a capacidade antioxidante com a quantidade de compostos fenólicos totais e antocianinas (ISHIGE, SCHUBERT e SAGARA, 2001; ROBERTS e GORDON, 2003; PINELO et al., 2004) e, para tanto, existem muitos métodos para avaliar a atividade antioxidante, podendo ser *in vitro* ou *in vivo* (ANTOLOLOVICH et al., 2002; CINTRA e MANCINI-FILHO, 1992). KUSKOSKI et al. (2005) relataram grande relação entre a quantidade de fenólicos totais e a ação antioxidante entre os métodos por radicais livres DPPH• e ABTS em polpas de frutas. A determinação da atividade de um antioxidante frente a radicais livres consiste em uma das estratégias mais utilizadas para aferições *in vitro*. Nesses métodos a perda de cor do radical livre ocorre de forma proporcional com a concentração de compostos fenólicos na amostra (ARENA, FALLICO e MACCARONE, 2001). A diversidade de métodos colorimétricos para avaliação do potencial antioxidante se deve ao fato de se tratar de substratos muito complexos, cujo conteúdo de dezenas de compostos apresenta diferentes grupos funcionais, polaridades e comportamento químico.

Diversos compostos cromóforos como ABTS, DPPH[•], DPMO e FRAP, são utilizados para determinar a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos presentes em frutos baseando-se na captura dos radicais livres gerados, operando, dessa forma, contra os efeitos prejudiciais dos processos de oxidação que levam à formação de espécies reativas do oxigênio (EROS) (HERTOG, HOLLMAN e KATAN, 1992; ARNOUS, MAKRRIS e KEFALAS, 2002; SELLAPPANS, AKOH e KREWER, 2002). Outros métodos, tais como o sistema beta-caroteno/ácido linoleico, apresentam mecanismo de co-oxidação, ou seja, se oxidando preferencialmente aos compostos presentes no sistema.

O método DPPH[•] é um dos mais utilizados entre os métodos químicos aplicados para determinar a capacidade de um composto em capturar radicais livres, por ser considerado prático, rápido e estável (ESPIN et al., 2000). O DPPH[•] (1,1-difenil-2-pictrazil) é um radical livre estável devido à possibilidade de deslocamento de seus elétrons na molécula. Esse deslocamento confere a ele uma intensa coloração púrpura, com comprimento de onda de absorção ao redor de 520 nm (SZABO et al., 2006). Nesse método, o antioxidante reage com o radical DPPH[•], doando a ele um átomo de hidrogênio e convertendo-o em sua forma reduzida (DPPH-H). Nesta reação, a solução metanólica de DPPH[•], inicialmente de coloração violeta intensa, torna-se amarelada e o grau deste descoramento indica a habilidade do antioxidante em seqüestrar o radical livre. (BRAND-WILLIANS et al., 1995; HUANG e PRIOR, 2005).

O funcionamento do método FRAP (Ferric Ability Reducing of Plasma) trata-se do fato de que em um meio a baixo pH o composto antioxidante é capaz doar um elétron

ao complexo íon Ferro 3^+ - TPTZ, reduzindo-o a Fe^{2+} - TPTZ, o que resulta em uma coloração azul intensa, com absorbância ao redor de 593nm(BENZIE & STRAIN, 1996).

O método de oxidação do beta-caroteno/ácido linoléico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do beta-caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico (MARCO, 1968; MILLER, 1971).

Um aspecto também importante a se considerar é que os pigmentos presentes nas uvas vermelhas, as antocianinas, pertencem ao grupo de flavonóides e apresentam capacidade antioxidante. São pigmentos solúveis em água, amplamente difundidas no reino vegetal e conferem as várias nuances de cores variando entre laranja, vermelha e azul, encontradas em frutas, vegetais, flores, folhas e raízes. Em alguns frutos as antocianinas estão localizadas principalmente na película, como é o caso da ameixa e uva, e em outros este pigmento encontra-se distribuído em todo o fruto (GIUSTI & WROLSTAD, 2001). Sendo assim, torna-se de fundamental importância analisar o conteúdo de antocianinas totais na geleia de uva, pois pode haver correlação direta entre a capacidade antioxidante e a presença desses flavonóides no produto.

O objetivo desse trabalho foi caracterizar a capacidade antioxidante das três formulações de geleia de uva preparadas em planta piloto para avaliar a adição de cascas desse fruto com intuito de obter maiores propriedades antioxidantes e, por consequência, benéficas, durante a ingestão do produto.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes

O etanol, metanol e ácido acético utilizados foram da marca J.T.Baker, grau cromatográfico, o clorofórmio e o ácido clorídrico foram da marca Alkimia, grau P.A. e a água utilizada foi purificada por meio do sistema Direct-Q 3 UV (Millipore Corporation, France). O reagente Folin Ciocalteu foi adquirido da marca Fukla. Os reagentes DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), beta-caroteno, ácido linoléico, Tween 20, cloreto férrico, TPTZ, cloreto de potássio e acetato de sódio foram fornecidos pela Sigma-Aldrich do Brasil.

2.1. Produção e Extração de Geleia

Foram produzidas três formulações de geleias, sendo a primeira sem casca (F1), a segunda (F2) com 3% em massa de cascas secas e a última com 6% em massa de cascas secas (F3). O método de produção está descrito no **capítulo 2** desta dissertação.

As extrações dos compostos fenólicos das formulações de geleia foram realizadas de acordo com o método por ultra-som validado no **capítulo 3** desta dissertação.

2.2. Atividade antioxidante.

2.2.1. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO RADICAL LIVRE DPPH•

O método utilizado foi baseado na metodologia de SCHERER & GODOY (2009). Foi preparada uma solução de DPPH• a 0,039 mg/mL, de forma a apresentar absorvância em 517 nm ao redor de 1,000. As determinações foram realizadas adicionando-se em

cada tubo de ensaio 3.9 mL da solução de DPPH• e 100 µL de extrato da amostra, ou o mesmo volume da solução utilizada para extrair as amostras, com o objetivo de se obter uma solução controle. As leituras das absorvâncias foram realizadas após 90 minutos de reação, à temperatura ambiente, na ausência de luz. As análises foram realizadas em triplicatas.

O decaimento da absorvância das amostras (A) foi correlacionado ao decaimento da absorvância do controle (C), resultando na porcentagem de inibição do radical livre DPPH• (I DPPH), que pode ser expressa por meio da **Equação 4.1**:

$$IDPPH(\%) = \frac{(C - A) * 100}{C} \text{ (Eq. 4.1)}$$

Os resultados foram comparados com uma curva padrão de ácido gálico e expressos em miligrama equivalente de ácido gálico por grama de amostra (mg GAE/g).

2.2.2. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO SISTEMA BETA-CAROTENO/ ÁCIDO LINOLÉICO

Esse método foi baseado no método utilizado por DASTMALCHI et al, 2008. Para o preparo da mistura reativa, adicionou-se 20 µL de ácido linoléico, 200 mg de Tween 20, 1 mg de β-caroteno, previamente diluído em 5 mL de clorofórmio, sendo tudo colocado em um balão redondo próprio para roto-evaporador. Posteriormente, a mistura foi submetida à completa evaporação do clorofórmio em roto-evaporador. A esta mistura isenta de clorofórmio, adicionou-se 50 mL de água destilada, e agitou-se vigorosamente.

Após o preparo da mistura, adicionou-se 6 mL dela em cada tubo contendo 50 µL do extrato de geleia e de solução de etanol a 50% para o controle. Após o preparo, mediu-se a absorvância (Abs 0) de todos os tubos, de modo a sempre estarem entre 0.600 e 0.700 em comprimento 470 nm.

Os tubos foram incubados em banho-maria a 50°C por 2 horas, para acelerar as reações de oxidação e iniciar o descoramento do β-caroteno. As análises foram realizadas em triplicatas e foi feita uma curva linear com padrão de composto fenólico. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da oxidação (AAI), que foi calculada em relação ao decaimento da absorvância do controle com a queda da absorvância das amostras (Aam) por meio da **Equação 4.2**:

$$AAI(\%) = \left(1 - \frac{(Abs_0 - Abs_{120})_{amostra}}{(Abs_0 - Abs_{120})_{controle}}\right) * 100 \quad \text{(Eq.4.2)}$$

Além da equação, foi construída uma curva com o padrão Quercetina, um flavonóide encontrado em uvas, de acordo com a literatura, e os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de Quercetina por grama de amostra (mg Q.E./g).

2.2.3. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP

A análise da capacidade antioxidante por FRAP é um método baseado na capacidade de redução do íon ferro, que passa de Fe³⁺ a Fe²⁺ (BENZI & STRAIN, 1996). Em meio ácido, o complexo férrico tripiridiltriazina (TPTZ) é reduzido ao ferroso, mudando sua coloração para azul na presença de um antioxidante.

Primeiramente, foi preparado o reagente FRAP, que se constituiu de 25 mL de tampão acetato, a concentração de $300 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, juntamente com 2,5mL da solução de TPTZ em ácido clorídrico, a uma concentração de $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e finalmente acrescentou-se 2,5 mL de cloreto férrico, à concentração de $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

O reagente FRAP foi colocado para reagir com as amostra na proporção de 600 μL deste para 80 μL de extrato de amostra, em um tubo de ensaio. O sistema foi levado em banho-maria por 15 minutos, a 37°C , seguido de resfriamento e leitura da absorbância. Os valores de absorbância foram medidos a 593 nm e então foram inseridos na equação da curva de calibração feita com ácido gálico, a diferentes concentrações conhecidas. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de geleia (GAE/g geleia).

2.2.4. CONTEÚDO DE ANTOCIANINAS TOTAIS

O conteúdo de antocianinas totais foi determinado pelo método da diferença de pH (GIUSTI & WROSLTAD, 2001), em que se dissolve em dois sistemas tampão: cloreto de potássio pH 1,0 (0,025M) e acetato de sódio pH 4,5 (0,4M).

Primeiramente o volume de solução tampão a pH 1,0 foi adicionado a 0,2mL de extrato da amostra, em quantidade suficiente para se obter densidade óptica na faixa de 1,000-1,200, a 510 nm. Após chegar nessa faixa de absorbância, foi realizado um cálculo do fator de diluição (FD) da amostra pela solução tampão, que foi posteriormente utilizado nos cálculos.

As medidas de absorvância foram feitas nos máximos de absorção de cada amostra na região visível e a 700 nm. A absorvância foi calculada a partir da equação:

$$A = (A_{\text{max. vis}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1,0} - (A_{\text{max vis}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4,5}. \quad (\text{Eq. 4.3})$$

A concentração de pigmentos monoméricos no extrato foi calculada e representada em cianidina-3-glicosídeo.

$$\text{Antocianinas}(\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}) = \frac{A \times PM \times FD \times 100}{(\epsilon \times l)} \quad (\text{Eq. 4.4})$$

onde: A = absorvância; PM = peso molecular; FD = fator de diluição e ϵ = absortividade molar.

A determinação de antocianinas foi obtida com base no volume de extrato e no peso da amostra ($\text{mg}100\text{g}^{-1}$) e, calculada aplicando valores de PM: 449,2 e ϵ :26900, que correspondem à cianidina 3-glicosídeo.

2.2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram feitas análises estatísticas para avaliar se os resultados se diferiam entre si. O software utilizado foi o STATISTICA 7.0, utilizando a função do teste t-student para variáveis independentes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise do Potencial Antioxidante

3.1.1. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO RADICAL LIVRE DPPH•

As análises foram realizadas nas três formulações de geleia e comparadas com o padrão de ácido gálico, cuja curva padrão foi construída utilizando-se o mesmo procedimento operacional feito para as amostras e que está apresentada na **figura 4.1**. A **tabela a 4.1** mostra os resultados obtidos por formulação:

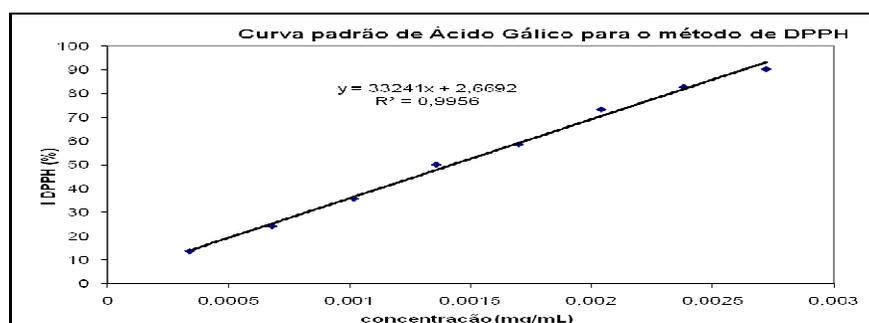


FIGURA 4.1. Gráfico da análise do potencial antioxidante método DPPH•, feita para o padrão de Ácido gálico.

TABELA 4.1. Resultados da análise do potencial antioxidante por meio do método pelo radical livre DPPH:

	F1*	F2**	F3***
Massa (g)	2,684 ± 0,67	2,634 ± 0,19	2,583 ± 0,033
Concentração inicial (mg/mL)	26,022 ± 0,71	26,343 ± 1,94	25,830 ± 0,33
Concentração no tubo (mg/mL)	0,650 ± 0,018	0,659 ± 0,049	0,646 ± 0,008
Absorbância (517 nm)	0,892 ± 0,02	0,669 ± 0,07	0,450 ± 0,03
(mg GAE/g)	0,659 ± 0,08^a	1,542 ± 0,243^b	2,627 ± 0,129^c

*= geleia de uva produzida sem adição de cascas secas;

**=geleia de uva produzida com adição de 3% em massa de cascas de uva secas;

***= geleia de uva produzida com adição de 6% em massa de cascas de uva secas

Por meio dos resultados, nota-se que as três formulações são significativamente diferentes entre si, a $p < 0,05$, sendo a formulação sem casca a que apresenta menor potencial antioxidante e esse valor crescente conforme houve aumento da adição de casca. Um dado interessante é que o aumento do potencial, quando avaliado por DPPH• é bem mais evidente do que o aumento no conteúdo de fenólicos totais, cujos resultados estão no **CAPÍTULO 2** desta dissertação. Entre a formulação F1, sem adição de casca, e a F2, o aumento do potencial foi de 130%. Quando se compara o potencial de F3 em relação a F2, houve aumento de 70%. Porém, assim como os resultados do conteúdo de fenólicos totais, a análise por DPPH•, mostra que o aumento do potencial não é linear, o que também desencoraja a inserção de maior porcentagem de casca na formulação de geleia.

3.1.2. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO SISTEMA BETA-CAROTENO/ ÁCIDO LINOLÉICO

As análises realizadas por esse método, para as três formulações, estão mostradas na **tabela 4.2**. Os resultados foram comparados com a curva padrão que foi construída para o flavonóide quercetina, cuja equação está mostrada na **figura 4.2**. Não foi possível obter experimentalmente, nas condições do laboratório, uma curva padrão de ácido gálico para este teste em questão.

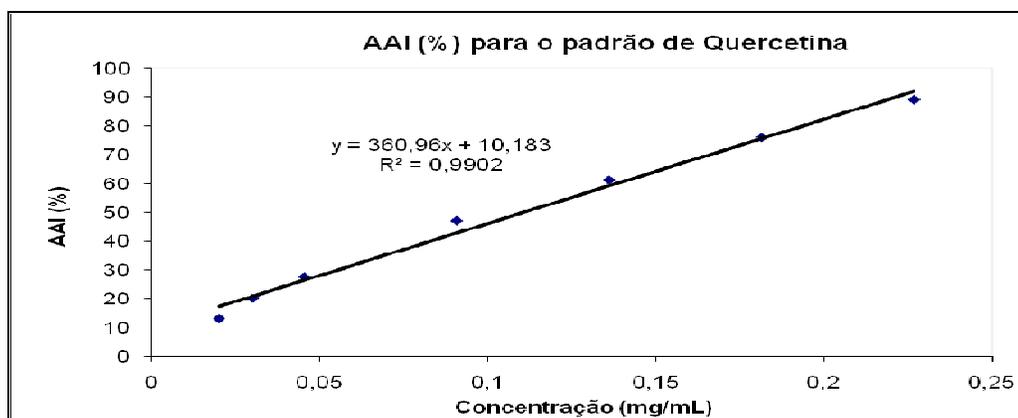


FIGURA 4.2. Gráfico da análise do potencial antioxidante pelo sistema beta-caroteno/ácido linoléico, feita para o padrão de Quercetina.

TABELA 4.2. Resultados da análise do potencial antioxidante por meio do sistema beta-caroteno/ ácido linoléico:

	F1	F2	F3
Massa (g)	2,684 ± 0,67	2,634 ± 0,19	2,583 ± 0,033
Concentração inicial (mg/mL)	26,022 ± 0,71	26,343 ± 1,94	25,830 ± 0,33
Concentração no tubo (mg/mL)	0,650 ± 0,018	0,659 ± 0,049	0,646 ± 0,008
% AA	14,337 ± 0,422	15,606 ± 0,917	23,102 ± 0,759
(mg Q.E./g)	25,70 ± 3,43^a	36,93 ± 7,22^b	89,024 ± 5,99^c

*= geleia de uva produzida sem adição de cascas secas;

**=geleia de uva produzida com adição de 3% em massa de cascas de uva secas;

***= geleia de uva produzida com adição de 6% em massa de cascas de uva secas

Os resultados na tabela mostram o mesmo perfil das análises feitas com o radical livre DPPH•, ou seja, a adição de cascas secas à formulação de geleia de uva contribuiu significativamente para o aumento do potencial antioxidante. Porém, na análise pelo sistema beta-caroteno/ácido linoléico em particular, a porcentagem de aumento do potencial foi bem maior quando se dobrou a quantidade de casca no produto. Esse fato leva a algumas suposições, como, por exemplo, o fato dos compostos fenólicos presentes nas cascas terem maior ação antioxidante quando atuam sob a forma de doadores de

hidrogênio para estabilizar os hidroperóxidos gerados, do que sob a forma de doadores de elétrons.

3.2.3. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP

As análises realizadas pelo método FRAP foram conduzidas comparando-se os resultados com a curva padrão que foi construída para o Ácido gálico, cujo gráfico é apresentado na **FIGURA 4.3**. Os resultados para as três formulações estão listados na **TABELA 4.3**.

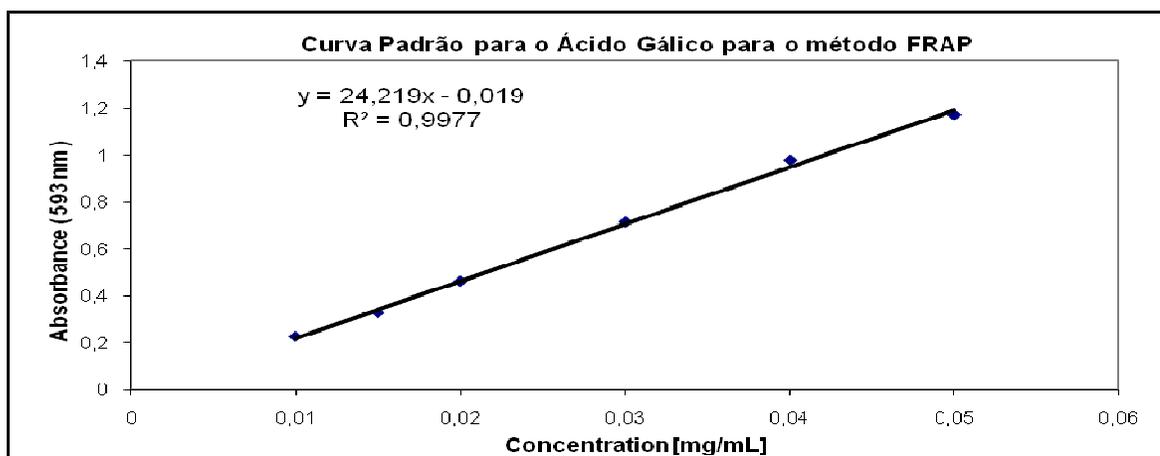


FIGURA 4.3. Gráfico da análise pelo método FRAP feita com o padrão de Ácido gálico.

TABELA 4.3. Avaliação do potencial antioxidante das formulações de geleia realizado pelo método FRAP.

	F1	F2	F3
Massa (g)	2,684 ± 0,67	2,634 ± 0,19	2,583 ± 0,033
Concentração inicial (mg/mL)	26,022 ± 0,71	26,343 ± 1,94	25,830 ± 0,33
Concentração no tubo (mg/mL)	3,061 ± 0,08	3,099 ± 0,23	3,039 ± 0,039
Absorbância (593nm)	0,153 ± 0,015	0,336 ± 0,030	0,557 ± 0,051
(mg GAE/g)	2,327 ± 0,255^a	5,158 ± 0,628^b	7,990 ± 0,377^c

*= geleia de uva produzida sem adição de cascas secas;

**=geleia de uva produzida com adição de 3% em massa de cascas de uva secas;

***= geleia de uva produzida com adição de 6% em massa de cascas de uva secas

Por meio dos resultados da avaliação do potencial antioxidante analisada pelo método FRAP, nota-se que houve diferença significativa entre as formulações de geleia de uva ($p < 0,05$). A formulação F2 apresentou aumento muito maior do potencial antioxidante em relação à formulação F1 (120%) do que a formulação F3 comparada à F2 (55%). Nesse caso, os resultados seguiram o mesmo ocorrido para a análise feita por DPPH•, em que a adição do dobro de cascas à formulação não aumenta seu potencial antioxidante tanto quanto o mesmo foi aumentado ao se adicionar a primeira porcentagem de cascas.

3.2.4. CONTEÚDO DE ANTOCIANINAS TOTAIS

Essa análise foi feita para quantificar o aumento do conteúdo de antocianinas totais quando se adicionou cascas secas às formulações de geleias. Primeiramente foi feita uma varredura de comprimento de onda, com o intuito de avaliar qual o máximo comprimento de absorção de cada geleia. Então se chegou à conclusão de que todos eram

muito próximos e ao redor de 543 nm, que é o comprimento de onda padrão para este ensaio. Assim este valor foi adotado para todas as medidas do ensaio. A medida de absorvância a 700 nm se faz necessária para subtrair todos os compostos presentes no extrato que apresentam cor, mas que não são antocianinas.

Para este ensaio não se utilizou um padrão de antocianina com finalidade de comparar concentrações equivalentes, devido ao fato de se tratar de padrões extremamente caros. A **TABELA 4.4** a seguir mostra os resultados obtidos para as amostras de geleia.

TABELA 4.4. Resultados obtidos por meio da avaliação do conteúdo de antocianinas totais nas formulações de geleias.

		F1	F2	F3
Absorbância (543 nm)	cloreto de potássio	0,994 ± 0,011	0,840 ± 0,047	0,660 ± 0,091
	acetato de sódio	0,229 ± 0,025	0,210 ± 0,025	0,105 ± 0,006
Absorbância (700 nm)	cloreto de potássio	0,014 ± 0,0006	0,012 ± 0,0009	0,007 ± 0,0009
	acetato de sódio	0,015 ± 0,0006	0,027 ± 0,0010	0,003 ± 0,000001
Fator de Diluição (FD)		1,4 ± 0,03	2,5 ± 0,06	5 ± 0,08
A		0,766 ± 0,0204	0,645 ± 0,025	0,566 ± 0,009
AM (mg/L)		17,908 ± 0,477^a	26,997 ± 1,04^b	47,258 ± 0,765^c

*= geleia de uva produzida sem adição de cascas secas;

**=geleia de uva produzida com adição de 3% em massa de cascas de uva secas;

***= geleia de uva produzida com adição de 6% em massa de cascas de uva secas

Por meio dos resultados apresentados na **TABELA 4.4**, é possível notar que o conteúdo de antocianinas totais aumenta significativamente ($p < 0,05$) conforme aumenta-se a quantidade de cascas secas adicionadas à geleia. Da formulação sem casca

para a F2 houve um aumento de aproximadamente 50%, enquanto que da F2, com 3% em massa de cascas secas, para a F3, com 6 %, houve aumento de 75%. Esses dados podem sugerir que, mesmo após a prensagem dos bagos de uva, em que há transferência de grande quantidade de antocianinas para a polpa, a maior porcentagem desses flavonóides ainda fica retida nas cascas. Outra suposição é de que mesmo após os tratamentos térmicos de secagem das cascas e de processamento da formulação de geleia, não são suficientes para degradar as antocianinas presentes nas matérias-primas. De acordo com o estudo feito por NACZK & SHAHIDI (2004), alguns compostos fenólicos estão fortemente ligados à parede celular dos vegetais e então são mais difíceis de serem removidos e também estão protegidos pelas fibras. Essa informação pode tornar-se importante, visto que se trata de compostos com potencial antioxidante que podem conferir seus efeitos benéficos aos consumidores desse derivado que é a geleia de uva.

4. CONCLUSÃO

Após a análise por diferentes métodos de avaliação do potencial antioxidante *in vitro*, observa-se que a adição de cascas de uva às formulações de geleia contribui significativamente com o aumento dos compostos fenólicos antioxidantes e que consideráveis quantidades destes, mesmo após os tratamentos térmicos, permanecem no derivado de uva.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, J. P.; NACCO, R.; FARO, A. Avaliação global de geleias de uva por meio do método de dados difusos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v 16, p 250-254, 1996.
- ANTOLOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183-198, 2002.
- ARENA, E.; FALLICO, B.; MACCARONE, E. Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. *Food Chemistry*, v 74, p 423-427, 2001.
- ARNOUS, A.; MAKRRIS, D.; KEFALAS, P. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *Journal of Food Compotion Analytical*, v 15, p 655-665, 2002.
- BENZIE, I.F.F. e STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, v 239(1), p 70-76, 1996.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v 28, p 25-30, 1995.
- CINTRA, R.M.G.; MANCINI-FILHO, J. Efeito antioxidante de especiarias: avaliação e comparação de métodos in vitro e in vivo. *Nutrire*, v 22, p 49-62, 1992.
- DASTMALCHI, K.; DORMAN, H.J.D.; OINONEN, P.P.; DARWIS, Y.; LAAKSO, I.; HILTUNEN, R. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon

balm (*Melissa officinalis* L.) extract. LWT 41, p 391 – 400, 2008. Available on line at www.sciencedirect.com

EMBRAPA UVA E VINHO - Cultivo da Videira Niágara Rosada em Regiões Tropicais do Brasil. Disponível em:

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvaNiagaraRosadaRegioesTropicais/mercado.htm>. Acesso em: 06/08/2008.

EMBRAPA UVA E VINHO. Processamento de Uva na Propriedade Rural. Disponível em:

<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/documentos/doc064.pdf>. Acesso em: 29/04/2010.

ESPIN, J.C.; SOLOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H.J.; GARCIA-VIGUERA, C.

Anthocyanin-based natural colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 48, p 1588-1592, 2000.

FALCÃO, A. P.; CHAVES, E. S.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R.; FALCÃO, L. D.;

BORDIGNON – LUIZ, M. T. Índice de polifenóis, antocianinas totais e atividade antioxidante de um sistema modelo de geleia de uvas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos [online]*, v27, n.3, p. 637-642, 2007.

GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E. Anthocyanins: characterization and measurement with

uv-visible spectroscopy. In: WROLSTAD, R.E. *Current protocols in food analytical chemistry*. New York: John Wiley & Sons, Unit. F1.2.1-13, 2001.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Content of potentially anti-

carcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the The Netherlands. *Journal of Agricultural Food. Chemistry*, v 40, p 2379-2383, 1992.

- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v 53, p 1.841-1.856, 2005.
- ISHIGE, K.; SCHUBERT, D.; SAGARA, Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biology Medicine*, v 30, p 433-446, 2001.
- KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*; v 25, p 726-732, 2005.
- LAGO, E. S.; GOMES, E.; SILVA, R. da. Produção de geleia de jambolão (*Syzygium cumini* Lamarck): processamento, parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v 26, p 847-852, 2006.
- MALACRIDA, C.R.; MOTTA, S da. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, v 25, p 659-664, 2005.
- MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of American Oil Society*, v 45, p 594-598, 1968.
- MELLO, L. M. R. de. *Vinicultura Brasileira: Panorama 2007*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008. Disponível em: http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/panorama_2007_vitivinicultura.pdf Acessado em: 03/2008.
- MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. *Journal of American Oil Society*, v 48, p 91, 1971.
- MOTA, R.V. Caracterização físico-química de geleia de amora preta. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v 26, p 539-543, 2006.

- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, v 1054, p 95-111, 2004.
- PINELO, M.; MONZOCCO, L.; NUÑEZ, M.J.; NICOLI, M.C. Interaction among phenolics in food fortification: negative synergism on antioxidant capacity. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v 52, p 1177-1180, 2004.
- ROBERTS, W.G.; GORDON, M.H. Determination of the antioxidant activity of fruits and vegetables by a liposome assay. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v 51, p 1486-1493, 2003.
- ROMERO-PÉREZ, A.I.; IBERN-GÓMES, M.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.; TORREBORONAT, M.C. Piceid, the major resveratrol derivative in grape juice. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v 47, p 1533-1536, 1999.
- SCHERER, R.; GODOY, Helena T . Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, v 112, p 654-658, 2009.
- SELLAPPANS, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v 50, p 2432-2438, 2002.
- SZABO, M.R.; IDITOIU, C; CHAMBRE, D; LUPEA, A.X. Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. *Chemical Paper*, v 61(3), p 204-216, 2007.

**CAPÍTULO 5: AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS
FENÓLICOS PRESENTES EM GELEIA DE UVA
POR HPLC**

Luciula Lemos Lima Morelli¹, Marcelo Alexandre Prado¹

**Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6121, 13083-862, Campinas,
SP, Brasil.**

RESUMO

Os avanços científicos na área de análise de alimentos trouxeram informações mais consistentes ao consumidor, tornando-o mais exigente na escolha de seus alimentos. No que tange aos compostos fenólicos antioxidantes, atualmente se faz necessário informar quais são os que estão presentes em determinado alimento. Seguindo essa tendência, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography-HPLC) possibilita caracterização desses compostos presentes no alimento. Esse trabalho visou avaliar os possíveis compostos fenólicos presentes em três formulações de geleia de uva, sendo uma delas de formulação tradicional, a segunda acrescida de 3% em massa de cascas de uva e a terceira acrescida de 6% em massa das mesmas. Foram escolhidos sete compostos fenólicos para o estudo em questão: ácido gálico, (-)-epicatequina, (+)-catequina, miricetina, quercetina, resveratrol e rutina. As condições cromatográficas foram: sistema de eluição por gradiente de fase móvel ácido orto - fosfórico 1% em água (pH=2,5), e acetonitrila, em coluna C-18, detector de arranjo de diodos UV-Vis. O método foi submetido a processos de validação, mostrando boa linearidade e repetitividade dentro dos limites aceitáveis (< 10%). Os limites de detecção ficaram entre 0,63 e 1,23 mg.kg⁻¹ e de quantificação entre 1,7 e 4,6 mg.kg⁻¹, dependendo dos compostos avaliados. Ácido gálico, (-) epicatequina, (+) catequina e rutina foram os compostos, dentre os que foram estudados encontrados em geleia de uva por meio do método utilizado.

Palavras-chave: compostos fenólicos, HPLC, geleia de uva.

ABSTRACT

The scientific progresses in the field of food analysis brought more consistent information to consumers, which drive them more concerned about their food choices. With respect to antioxidant phenolic compounds, nowadays it is necessary to inform which of them are presented in each product. Following this trend, High Performance Liquid Chromatography allows characterization of these compounds. This work aimed to evaluate the major phenolic compounds presented in three formulations of grape jam, as being one the traditional formulation, the second with addition of 3% weight of grape skin and the third with addition of 6% weight of the same ingredient. Seven phenolic compounds were chosen for this study: galic acid, , (-)-epicatechin, (+)-catechin, myricetin, quercetin, resveratrol and rutin. The chromatographic conditions were: gradient elution system, with a mobile phase of ortho-phosphoric acid 1% in water (pH=2,5) and acetonitrile, C-18 column, diode array detector UV-Vis. The method was subjected to evaluation procedures, thus showing good linearity and repeatability under the acceptable levels (<10%). The detection limits were between 0,63 and 1,23 mg.kg⁻¹ along with the quantification limits, that were between 1,7 and 4,6 mg.kg⁻¹ . The recovering rates were between 80 and 109%. Galic Acid, (-) epicatechin, (+) catechin and rutin were the phenolic compounds, among the ones studied, found in grape Jam through the developed method.

Key-words: phenolic compounds, HPL, grape jam.

1. INTRODUÇÃO

A constante busca pela saúde e bem estar leva os consumidores a procurar mais informações a respeito de como se alimentar corretamente e quais são os alimentos que melhor se adequam na promoção de tais benefícios. Dentre os compostos benéficos mais procurados em um alimento considerado “saudável” estão os antioxidantes, que podem atuar na prevenção de determinadas enfermidades como doenças cardiovasculares, envelhecimento precoce, certos tipos de câncer, dentre outras. Porém, há uma crescente tendência de querer conhecer mais a fundo quais são os compostos, dentre a imensa gama de antioxidantes existentes, que estão presentes em determinado alimento.

Apesar das técnicas colorimétricas serem importantes ferramentas de detecção *in vitro* da presença de compostos fenólicos, é importante caracterizar compostos fenólicos de forma individual no alimento. Nesse contexto, a cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) é a técnica mais comumente utilizada, podendo estar acoplada a ela detectores como o de arranjo de diodos (DAD), como o de fluorescência ou de espectrometria de massas (MS). A utilização da HPLC é uma ferramenta que auxilia os mais variados estudos, pois separa compostos presentes em uma matriz, que podem ser comparados a padrões para identificação (HÄKKINEN et al, 1999; PEREZ-MAGARIÑO et al, 1999; SCHIEBER et al, 2001; BIANCO et al, 1997; ANDRADE et al 2001; KALLITHRAKA et al, 2001).

Grande parte dos autores utiliza a caracterização cromatográfica por HPLC empregando coluna em fase reversa C18 (RP-HPLC) (BUIARELLI et al 1995; LOPEZ et al, 2001; ESCARPA & GONZALES, 2000). Este fato pode ser observado por se tratar

de uma coluna facilmente utilizável para uma gama variada de compostos, relativamente barata e que suporta ampla variação de pH (entre 1,0 a 12,0), facilitando a utilização de diferentes tipos de solventes como fase móvel.

Para detecção de compostos fenólicos em uva e seus derivados, utilizam-se diferentes solventes como fase móvel, empregados muitas vezes em um mesmo método de corrida cromatográfica em concentrações que variam com o tempo, sendo a comumente utilizada eluição por gradiente, que pode diminuir significativamente os tempos de corrida. Esses solventes, que podem ser soluções-tampão, tais como fosfato ou acetato, metanol, água ou acetonitrila, atuam aumentando ou diminuindo a polaridade do meio, no intuito de melhorar a separação entre os compostos (ALÉN-RUIZ et al., 2009; BAER et al., 2008; MEZADRI et al., 2008; MASA & VILANOVA, 2008; GARCÍA-FALCÓN et al., 2007; GÜRBÜZ et al., 2007; PERÉZ-LAMELA et al., 2007; MASA et al., 2007; VALENTÃO et al. 2007; LOPEZ et al., 2001; ESCARPA & GONZALEZ, 2000; ESCARPA et al., 2000).

Em se tratando de detectores, o mais frequentemente utilizado para detecção de compostos fenólicos é o DAD, por tratar-se de um equipamento que pode realizar varredura em um amplo espectro de comprimentos de onda, compatível com a grande variedade de moléculas que são os compostos fenólicos (MEZADRI et al., 2008). Apesar disso, o detector por fluorescência também pode beneficiar a identificação de compostos fenólicos durante a separação cromatográfica. GOMÉS-ALONSO et al. (2007) compararam o detector DAD o detector por fluorescência para compostos fenólicos e notaram que o último pode promover a diminuição do limite de quantificação

de alguns compostos como as catequinas e evitar a interferência causada entre alguns compostos fenólicos presentes.

Ainda que se compare o tempo de retenção e o espectro de absorção de cada composto com os seus respectivos padrões, quando se acopla o HPLC ao MS este se torna a melhor ferramenta utilizada na confirmação de compostos. Ele dispensa a necessidade de padrões, que em sua maioria são muito caros, apresentam limites de detecção menores que os demais detectores e auxilia na detecção de compostos que coeluíram por meio das diferentes razões massa/carga (m/z) apresentadas (GUERRERO et al., 2009; DOWNEY & ROCHFORD, 2008; KÖHLER et al., 2008; MCCALLUM et al., 2007; BRAVO et al., 2006). A grande desvantagem desse detector é que ele custa muito mais caro que o próprio equipamento HPLC, o que faz com que a maioria dos trabalhos encontrados na literatura ainda esteja com detecção por DAD.

O presente trabalho visou desenvolver um método de separação para identificar e quantificar os compostos fenólicos majoritários presentes em três formulações de geleia de uva produzida com a variedade IAC 138-22, sendo uma delas de formulação tradicional, a segunda com adição de 3% de cascas de uvas secas e a terceira com adição de 6% das mesmas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes

Os solventes: etanol, metanol e acetonitrila, todos com grau cromatográfico, foram utilizados da marca J.T.Baker. O Ácido orto-fosfórico foi utilizado da marca MERCK . Os padrões cromatográficos: ácido gálico, (-)-epicatequina, (+)-catequina, miricetina, quercetina, resveratrol e rutina foram obtidos pela Sigma – Aldrich do Brasil. A água utilizada nos experimentos foi purificada pelo sistema Mili-Q (Millipore Corporation). As soluções de padrões foram preparadas em metanol e mantidas a -10°C, ao abrigo da luz.

2.2. Extração das Amostras

As amostras utilizadas no método proposto foram as três formulações de geleia de uva com a Variedade IAC 138-22, sendo a primeira de formulação tradicional (**F1**), a segunda acrescida de 3% em massa de cascas de uva secas (**F2**) e a terceira acrescida de 6% em massa das mesmas cascas (**F3**). As geleias foram extraídas conforme o ensaio proposto no **capítulo 3** desta dissertação, tendo posteriormente o solvente evaporado em roto-evaporador até a secura e ressuspendidas em 1 mL de metanol, seguido de filtração em filtro de poros 0,45 µm, antes da injeção no HPLC. Cada formulação sofreu 3 extrações e cada extrato foi injetado 3 vezes. Para o cálculo da recuperação o procedimento foi o mesmo, porém adicionando os padrões em concentrações conhecidas em uma geleia de abacaxi, previamente às extrações.

2.3. Equipamento e Condições Cromatográficas

Foi utilizado um equipamento da marca Varian 1050 com injetor manual, alça de amostragem de 20 μL e bomba ternária, acoplado a um detector de arranjo de diodos (UV-Vis) da marca Agilent G1315B. A coluna cromatográfica utilizada foi do tipo fase reversa, C-18 (250 mm x 4,5 mm) da marca Waters, Spherisorb ODS e pré-coluna com o mesmo recheio e diâmetro da coluna. O método cromatográfico foi baseado em Bravo et al. (2006), e sobre ele foram feitas as modificações. A fase móvel constituiu-se em ácido orto-fosfórico a 1% em água (A) e Acetonitrila (B). O gradiente de eluição iniciou-se com 90% de “A” em um fluxo de 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Essa condição foi mantida por 5 minutos. Entre 5 e 40 minutos a concentração de “A” passou para 60%. Entre 40 e 45 minutos houve o aumento da porcentagem de “A” para 90% e essa condição foi mantida até 50 minutos, quando a corrida chegava ao fim. A detecção de todos os compostos foi realizada a comprimento de onda 210 nm.

2.4. Metodologia de Validação

A seletividade do método foi avaliada por meio dos espectros obtidos pelo detector DAD. Para avaliar a faixa linear de trabalho, foram construídas curvas de calibração para cada um dos padrões utilizados no experimento, incluindo concentrações entre 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e 14 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. A repetitividade do método foi avaliada em dois níveis de concentração (4 e 8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) em 10 injeções de cada nível. A precisão intermediária foi avaliada comparando-se curvas analíticas feitas em três dias diferentes. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados dividindo-se o desvio padrão pelo coeficiente angular da curva analítica, para cada um dos padrões. Esse resultado foi multiplicado por

3,3 para o LD e por 10 para obter o LQ (Ribani et al., 2004). A recuperação (Rec) foi avaliada em dois níveis de concentração (4 e 10 mg.L⁻¹), calculada de acordo com a **Equação 5.1**.

$$Rec (\%) = \frac{Cf - Ci}{Ca} \times 100 \quad (\text{Eq. 5.1})$$

Onde: Cf = concentração obtida na amostra após a extração fortificada;

Ci = concentração obtida na amostra extraída sem fortificação;

Ca = concentração de padrão adicionada à amostra

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha dos padrões de compostos fenólicos utilizados no experimento foi feita a partir de pesquisa bibliográfica sobre uva e seus derivados líquidos (vinho e suco), visto que há escassez de trabalhos feitos com a geléia da fruta. De acordo com os compostos mais identificados nessas matrizes, chegou-se que os compostos fenólicos mais encontrados são (+)-catequina, (-)-epicatequina, rutina, miricetina, quercetina, resveratrol, ácido gálico, além das antocianinas, que não serão abordadas nesse capítulo.

O processo experimental teve início com o desenvolvimento do método analítico e avaliação da seletividade para os compostos fenólicos selecionados. Após todos os compostos estarem devidamente separados entre si no cromatograma, prosseguiu-se com a análise da faixa linear de trabalho, por meio da construção de curvas de calibração. As concentrações avaliadas ficaram entre 1 e 14 mg.L⁻¹ (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 mg.L⁻¹),

conferindo resultados satisfatórios devido à obtenção de R^2 (coeficiente de correlação) acima de 0,99. Por meio desses resultados, foi possível calcular LD e LQ para cada um dos compostos, conforme mostra a **TABELA 5.1**.

TABELA 5.1. Equações das curvas de calibração dos compostos, R^2 , LD e LQ.

Compostos Fenólicos	Equações da Curva de Calibração	R^2	LD (mg.L ⁻¹)	LQ (mg.L ⁻¹)
Ácido gálico	$y = 165,17x + 43,021$	0,9931	0,865	2,621
Epicatequina	$y = 271,33x - 99,605$	0,9932	0,980	2,970
Catequina	$y = 279,79x - 29,657$	0,9985	0,573	1,735
Rutina	$y = 79,838x - 0,7881$	0,9953	0,894	2,709
Miricetina	$y = 240,89x - 40,074$	0,9962	0,634	1,921
Resveratrol	$y = 143,3x - 4,6976$	0,9911	0,561	1,700
Quercetina	$y = 160,91x - 64,262$	0,994	0,821	2,487

Após a determinação da faixa linear de trabalho, escolheram-se duas concentrações dentro da faixa linear para avaliar a repetitividade (4 e 8 mg.L⁻¹), injetando cada concentração por 10 vezes consecutivas e verificando o tempo de eluição e a área conferida. Pode-se observar por meio da **TABELA 5.2 e TABELA 5.3** que os desvios padrões relativos (DPR) para a concentração de 4 e 8 mg.L⁻¹, resultantes da divisão de cada desvio padrão pela sua respectiva média, estão dentro de limites aceitáveis (< 10%) (Ribani et al., 2004).

TABELA 5.2. Resultados da avaliação da repetitividade do método. Desvios Padrões relativos obtidos para a concentração 4 mg.L⁻¹.

Compostos Fenólicos	Tempo (min)			Área (mAU)		
	Média	Desvio Padrão	DPR (%)	Média	Desvio Padrão	DPR (%)
Ácido gálico	7,86	0,20	2,53	757	54,54	3,53
Epicatequina	19,44	0,47	2,43	1057,37	107,16	5,12
Catequina	23,43	0,38	1,60	1077,23	86,26	3,75
Rutina	30,38	0,28	0,93	329,31	53,03	7,71
Miricetina	36,20	0,44	1,22	906,50	55,37	2,89
Resveratrol	37,75	0,46	1,23	590,13	63,68	5,50
Quercetina	42,09	0,59	1,39	586,87	31,00	2,57

TABELA 5.3. Resultados da avaliação da repetitividade do método. Desvios Padrões relativos obtidos para a concentração 8 mg.L⁻¹.

Compostos Fenólicos	Tempo (min)			Área (mAU)		
	Média	Desvio Padrão	DPR (%)	Média	Desvio Padrão	DPR (%)
Ácido gálico	7,98	0,20	2,53	1577,10	7,19	0,46
Epicatequina	19,91	0,47	2,43	2091,17	107,16	5,12
Catequina	23,00	0,38	1,60	2269,77	37,61	1,66
Rutina	29,78	0,28	0,93	687,64	53,03	7,71
Miricetina	36,58	0,44	1,22	1913,80	55,37	2,89
Resveratrol	38,05	0,46	1,23	1157,77	63,68	5,50
Quercetina	42,30	0,59	1,39	1204,93	31,00	2,57

Após realizar os procedimentos de repetitividade, partiu-se para os testes de recuperação dos padrões de compostos fenólicos estudados em uma geleia livre desses compostos. Foi utilizada uma geleia de abacaxi de mercado e esta foi submetida a dois

processos. Primeiramente procedeu-se toda a extração conforme descrito no item 2.2 deste capítulo 5. O objetivo desse experimento era se certificar de que a amostra em questão estava realmente isenta dos compostos de estudo. Depois disso, outras alíquotas dessa geleia foram acrescidas dos padrões em uma concentração tal que o conjunto final resultasse em 10 ppm e 4 ppm, homogeneizadas e submetidas ao mesmo processo de extração. A **TABELA 5.4** mostra os resultados das taxas médias de recuperação obtidas para cada padrão estudado:

TABELA 5.4. Resultados dos testes de recuperação feitos em dois níveis e em triplicata para cada padrão de composto fenólico do presente estudo.

Compostos Fenólicos	% Recuperação (10 ppm)	% Recuperação (4ppm)
Ácido gálico	100,20 ± 2,67	92,65 ± 3,34
Epicatequina	83,78 ± 7,02	79,57 ± 8,29
Catequina	84,02± 8,25	80,44 ± 9,53
Rutina	109,68± 1,47	98,59 ± 6,78
Miricetina	94,58± 72,91	86,97 ± 1,00
Resveratrol	89,85± 13,53	79,86 ± 12,20
Quercetina	93,98± 4,49	89,40 ± 1,31

Os resultados variam ente 80 e 109% de taxa de recuperação. Esses valores estão dentro dos limites aceitáveis, de acordo com Ribani e colaboradores (2004), o que mostra que o método utilizado durante a extração e separação cromatográfica foi efetivo para os compostos de interesse. Em estudos com matrizes líquidas, como vinhos e suco, alguns autores encontraram semelhante faixas de taxa de recuperação para os mesmos

compostos do estudo, ou seja, entre 80 e 110% (GARCÍA-FALCÓN et al.,2007; DOPICO-GARCÍA et al.,2007; CHEN et al., 2001). A exceção foi em relação ao ácido gálico, cujas taxas foram bem inferiores ao presente estudo devido ao fato de haverem utilizado a extração em fase sólida (SPE) como sendo uma etapa a mais do processo extrativo. OLIVEIRA (2010) analisou os mesmos flavonóides em geléias de outras frutas e encontrou taxas de recuperação entre 70 e 83%. Como foram realizados poucos estudos com geleia, principalmente de uva, a literatura encontrada não dispunha de dados comparativos tão próximos quanto os anteriores.

Após a obtenção dos dados de taxa de recuperação, procedeu-se com os experimentos nas formulações de geleia de uva IAC 138-22 com o objetivo de identificar e quantificar os compostos presentes nas amostras. Para cada injeção, os picos foram comparados aos padrões por meio de semelhanças entre tempo de retenção e espectro de absorção. Além das duas informações, os padrões também eram adicionados aos extratos para que, caso houvesse aumento da área do pico de interesse, se confirmasse a presença daquele determinado composto. Os resultados estão expressos na **TABELA 5.5**, a seguir:

TABELA 5.5. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes nas três diferentes formulações de geleia de uva

Compostos Fenólicos Identificados	Concentração (mg.Kg ⁻¹)		
	F1 (0% casca)	F2 (3% casca)	F3 (6% casca)
Ácido gálico	1,78 ^a ± 0,10	4,40 ^b ± 0,41	6,02 ^c ± 0,54
Epicatequina	1,64 ^d ± 0,081	6,09 ^e ± 0,37	19,27 ^f ± 0,72
Catequina	1,39 ^g ± 0,025	6,44 ^h ± 0,47	21,96 ⁱ ± 1,11
Rutina	6,43 ^j ± 0,27	16,13 ^l ± 0,87	22,39 ^m ± 1,54

Obs: as letras diferentes para cada composto analisado mostram que os resultados são diferentes entre si ($p < 0,05$), por composto analisado.

Por meio dos resultados nota-se que, dos sete padrões utilizados no estudo, somente quatro foram identificados nas amostras. Esse é um fato intrigante, visto que a maioria dos autores, quando estuda uva e seus derivados como vinho e suco, encontrou os três outros compostos. Assim pode ter havido duas possibilidades. A primeira pode ter sido ao fato desses compostos estarem presentes nas geléias em sua forma glicosilada, como a rutina, que foi o único padrão glicosilado do estudo. Se este for o caso, tanto o espectro de absorção quanto o tempo de retenção serão diferentes de seus respectivos padrões glicosilados. Assim, pelo fato de não se saber quais eram e também como o laboratório não dispunha dos padrões na forma glicosilada, não foi possível encontrar tais compostos nas amostras. Outra possibilidade poderia ser devido à fabricação das formulações terem empregado uma variedade de uva relativamente nova, para a qual ainda não há estudo de caracterização de seus compostos fenólicos. Assim pode ser que realmente esses compostos não façam parte da variedade em questão e, portanto, também não farão parte da geleia dessa uva.

Outra constatação possível de ser feita é a de que houve aumentos significativos da quantidade de todos os compostos identificados quando se adicionava cascas secas de uvas às geléias. O que é possível inferir neste caso é que, ao se prensar os bagos de uva para extrair a polpa e com ela fabricar a geleia tradicional, maior quantidade dos compostos ainda permaneceram na casca em detrimento da quantidade que foi transferida para a polpa.

Curiosamente, ao dobrar a quantidade de casca na formulação de geleia, da formulação F2 para a F3, o aumento da quantidade de catequina e epicatequina foi maior que o dobro. A situação é contraditoriamente relevante, pois o mesmo perfil não ocorreu para ácido gálico e rutina, cujos aumentos foram proporcionais ao aumento ocorrido entre formulação tradicional (F1) e F2. Como suposição, podem ter havido outros compostos que co-eluíram com a catequina e epicatequina e que apresentam o mesmo espectro de absorção, o que aumentou o sinal do pico formado, mas não representou somente os compostos de interesse. Se isso tiver ocorrido, reafirma-se a importância de se utilizar um detector como o espectrômetro de massas, que poderá diferenciar um composto do outro pela razão massa/carga de cada uma das substâncias coeluídas.

Outra possível explicação poderia ser que, antes de serem inseridas na fabricação, as cascas foram moídas, mas o resultado da moagem não foi peneirado antes delas serem adicionadas à geleia. Isso poderia ter gerado problemas na homogeneização das cascas e possivelmente ter criado pontos de maior concentração das mesmas no produto. Porém foram realizadas 3 extrações da mesma formulação e também havia triplicatas de formulação, ou seja, foram realizadas nove extrações e vinte e sete injeções no HPLC,

com desvios padrões relativos aceitáveis entre os resultados de uma e outra. Apesar de todo esse cuidado, talvez ainda houvesse pontos com maior concentração de casca que resultaram em aumento excessivo do conteúdo de fenólicos na formulação F3 em relação à F2. Cabe como sugestão pulverizar e peneirar as cascas antes de adicioná-las ao produto com o intuito de avaliar esse aumento tão maior para os dois flavonóides.

4. CONCLUSÃO

Foram encontrados nas geléias estudadas ácido gálico, (-)-epicatequina, (+)-catequina e rutina por meio do método proposto no estudo. A validação do método foi eficaz, pois ele se mostrou seletivo, linear e preciso. Os coeficientes de correlação para as concentrações entre 2 e 14 mg.Kg⁻¹ foram acima de 0,99. A repetitividade do método esteve abaixo de 10%, valor aceito pela literatura e a precisão, avaliada por meio das taxas de recuperação dos compostos de estudo, foi acima de 80%, dentro dos padrões requeridos. A inserção de cascas de uva secas à geleia se mostrou uma prática muito interessante, visto que há um significativo aumento de compostos fenólicos estudados, que são conhecidos na literatura como bons agentes antioxidantes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALÉN-RUIZ, F.; GARCÍA-FALCÓN, M.S.; PÉREZ-LAMELA, M.C.; MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; SIMAL-GÁNDARA, J. Influence of major polyphenols on antioxidant

activity in Mencía and Brancellao red wines. *Food Chemistry*, v 113, Issue 1, p 53 – 60, 2009.

ANDRADE, P.B.; MENDES, G.; FALCO, V.; VALENTÃO, P.; SEABRA, R.M. - Preliminary study of flavonols in port wine grape varieties - *Food Chemistry*, v 73, 397-399, 2001.

BRAVO, M. N.; SILVA, S.; COELHO, A. V.; VILAS BOAS, L.; BRONZE, M. R. Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. *Analytica Chimica Acta*, v 563, p 84 – 92, 2006.

BUIARELLI, F.; CARTONI, G.; COCCIOLI, F.; LEVETSOVITOU, Z. - Determination of phenolic acids in wine by high-performance liquid chromatographic with a microbore column - *Journal of Chromatography A*; v 695; p 229-235, 1995.

BIANCO, M.A.; SAVOLAINEN, H. - Phenolic acids as indicators of wood tannins - *The Science of the Total Environment*; 203;p 79-82, 1997.

BAER, D. v.; RENTZSCH, M.; HITSCHFELD, M.A.; MARDONES, C.; VENGARA, C.; WINTERHALTER, P. Relevance of chromatographic efficiency in varietal authenticity verification of red wines based on their anthocyanin profiles: Interference of pyranoanthocyanins formed during wine ageing. *analytica chimica acta*, v 621, p 52–56, 2008.

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

DOPICO-GARCÍA, M.S.; VALENTÃO, P.; GUERRA, L.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, P.B. Experimental design for extraction and quantification of phenolic compounds and organic acids in white “Vinho Verde” grapes. *Analytica Chimica Acta*, v 583, p 15–22, 2007.

DOWNEY, M.O.; ROCHFORD, S.. Simultaneous separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectral identification of anthocyanins and flavonols in Shiraz grape skin. *Journal of Chromatography A*, v 1201, p 43–47, 2008.

ESCARPA, A.; GONZALEZ, M.C. - Optimization strategy and validation of one chromatographic method as approach to determine the phenolic compounds from different sources. - *Journal of Chromatography A*; v 897 p 161-170, 2000.

ESCARPA, A.; GONZALEZ, M.C. - High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties - *Journal of Chromatography A*; v 823, p 331–337, 1998.

GARCÍA-FALCÓN, M. S., PÉREZ-LAMELA, C., MARTÍNEZ-CARBALLO, E., & SIMAL-GÁNDARA, J.(2007). Determination of phenolic compounds in wines: Influence of bottle storage of young red wines on their evolution. *Food Chemistry*, v 105, p 248–259, 2007.

GÓMEZ-ALONSO, S.; GARCÍA-ROMERO, E.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, v 20, p 618–626.

GUERRERO R. F.; LIAZID, A.; PALMA, M.; PUERTAS, B.; GONZÁLEZ-BARRIO, R.; GIL-IZQUIERDO, A.; GARCÍA-BARROSO, C.; CANTOS-VILLAR, E. Phenolic

characterisation of red grapes autochthonous to Andalusia. *Food Chemistry*, v 112, p 949–955, 2009.

GÜRBÜZ,O.; GÖÇMEN, D.; DAGDELEN,F.; GÜRSOY,M.; AYDIN,S.; SAHIN,I.; BÜYÜKUYSAL,L.; USTA, M. Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry*, v 100, p 518–525, 2007.

HÄKKINEN, S.; HEINONEN, M.; KÄRENLAMPI, S.; MYKKÄNEN, H.; RUUSKANEN, J.; TÖRRÖNEN, R. - Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. - *Food Research International*, v 32, p 345-353, 1999.

KALLITHRAKA, S.; ARVANITTOYANNIS, I.; EL-ZAJOULI, A.; KEFALAS, P. - The application of an improved method for trans-resveratrol to determine the origin of Greek red wines. -*Food Chemistry*, v 75, p 355–363, 2001.

KÖHLER,N.; WRAY, V.; WINTERHALTER, P. Preparative isolation of procyanidins from grape seed extracts by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, v 1177, p 114–125, 2008.

LOPEZ, M.; MARTÍNEZ, F.; DEL VALLE, C.; ORTE, C.; MIRO, M. - Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. - *Journal of Chromatography A*; v 922, p 359–363, 2001.

MASA A.; VILANOVA, M.; POMAR, F. Varietal differences among the flavonoid profiles of white grape cultivars studied by high- performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v 1164, p 291–297, 2007.

- MASA, M.; VILANOVA, M. Flavonoid and aromatic characterisation of cv. Albarín Blanco (*Vitis vinifera* L.). *Food Chemistry*, v 107, p 273–281, 2008.
- MCCALLUM, J.L.; YANG, R.; YOUNG, J.C.; STROMMER, J.N.; TSAO, R. Improved high performance liquid chromatographic separation of anthocyanin compounds from grapes using a novel mixed-mode ion-exchange reversed-phase column. *Journal of Chromatography A*, v 1148, p 38–45, 2007.
- MEZADRI, T.; VILLANOVA, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives *Journal of Food Composition and Analysis*, v 21, p 282–290, 2008.
- OLIVEIRA, R.G. Identificação, quantificação e caracterização antioxidante de flavonóides e vitamina C em geleias de frutas. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil, 2010.
- PEREZ-MAGARIÑO, S.; REVILLA, I.; GONZALEZ-SANJOSE, M.L.; BELTRAN, S. - Various applications of liquid chromatography–mass spectrometry to the analysis of phenolic compounds. - *Journal of Chromatography A*, v 847, p 75–81, 1999.
- PÉREZ-LAMELA, C.; GARCÍA-FALCÓN, M.S.; SIMAL-GÁNDARA, J.; ORRIOLS-FERNÁNDEZ, I. Influence of grape variety, vine system and enological treatments on the colour stability of young red wines. *Food Chemistry*, v 101, p 601–606, 2007.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. & MELO, L.F.C. Validação em métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova*, v27, p 771–780, 2004.

SCHIEBER, A.; KELLER, P.; CARLE, R. - Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*; v 910, p 265–273, 2001.

VALENTÃO, P.; SEABRA, R.M.; LOPES, G.; SILVA, L.R.; MARTINS, V. RUJILLO, M.E.; VELASQUÉZ, E.; ANDRADE, P.B. Influence of *Dekkera bruxellensis* on the contents of anthocyanins, organic acids and volatile phenols of Dão red wine. *Food Chemistry*, p 100, p 64–70, 2007.

CONCLUSÃO GERAL

- A geleia de uva se mostrou ser um alimento fonte de compostos fenólicos de ação antioxidante. A que se ressaltar o fato de que a variedade IAC 138-22, utilizada no preparo das formulações desse estudo conferiu aumento significativo da capacidade antioxidante *in vitro* para tal alimento. Assim essa variedade, que atualmente está sendo largamente empregada na produção de vinhos no Estado de São Paulo, pode começar a ter um outro emprego e aumentar a população de consumidores que possivelmente se beneficiarão dela, tais como crianças e portadores de doenças hepáticas.
- A inserção de cascas secas às geleias contribuiu significativamente para o aumento do potencial antioxidante *in vitro* das formulações. Em relação ao fruto *in natura*, as geleias de uva tradicionais perderam ao redor de 76% dos compostos fenólicos originais. Porém, quando se adicionou casca essas perdas diminuíram, chegando a uma diferença de 24% entre frutas frescas e geleias.
- O estudo de otimização da extração de compostos fenólicos teve importância fundamental na avaliação do potencial antioxidante *in vitro* das formulações utilizadas, pois aumentou o rendimento dos compostos de interesse em aproximadamente 65%, com a vantagem de diminuir significativamente o tempo de análise (de 10 para 3 horas), além de ter possibilitado a troca do metanol, que é um solvente extremamente tóxico, para o etanol, mais ambientalmente correto.
- Analisando o potencial antioxidante *in vitro* por mais de um mecanismo colorimétrico, pode-se concluir que, para todas as situações, a geleia com 6% de

casca conferia os maiores resultados. Isso mostra que ela apresenta compostos antioxidantes que atuam nas diferentes maneiras de impedir a oxidação do meio.

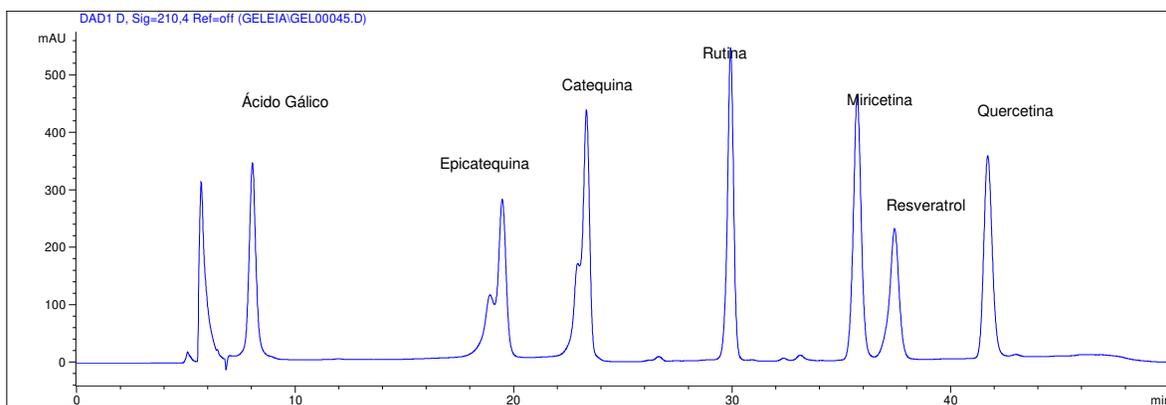
- O método cromatográfico utilizado se mostrou eficaz para os compostos fenólicos utilizados no estudo, visto que ele promoveu boa separação entre eles e proporcionou repetitividade e taxa de recuperação dentro dos limites aceitáveis. Foram encontrados e quantificados os compostos: ácido gálico, epicatequina, catequina e rutina. Os demais compostos apesar de serem comumente encontrados na literatura para uva e derivados, não foram encontrados nesse estudo, podendo haver várias razões, entre elas, a possibilidade de estarem ligados a açúcares ou outras substâncias que alteram seu tempo de retenção e espectro de absorção em relação aos padrões adotados para o estudo.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Devido ao curto espaço de tempo, não foram quantificados os compostos fenólicos das frutas *in natura* e comparados com as geleias. Mas considero um trabalho importante, para avaliação de qual dos compostos representa a maior perda frente ao processo.
- As análises cromatográficas não foram totalmente conclusivas, pois há indícios de que muitos dos compostos fenólicos podem estar glicosilados, o que altera o tempo de retenção e o espectro de absorção das substâncias em relação às respectivas agliconas. Uma sugestão seria utilizar o Espectrômetro de Massas para tentar identificá-los por meio de análise da relação massa/carga e dos fragmentos, que podem atuar como marcadores de cada composto e também para verificar a que tais compostos estão ligados.
- Nesse trabalho não foram identificadas as antocianinas, embora se conheça a sua importante função em um vegetal como a uva e, conseqüentemente, para seus derivados. O motivo é o alto custo dos padrões deste grupo, que inviabilizou o estudo no laboratório. Como sugestão fica a identificação desses compostos tanto na fruta *in natura*, quanto nas geleias.
- Um aspecto muito importante também é avaliar a biodisponibilidade dos compostos fenólicos presentes nas formulações de geleia e também sua ação antioxidante *in vivo*, pois a avaliação *in vitro*, como foi feita nessa dissertação, proporciona apenas resultados comparativos entre as matrizes alimentícias, mas não representa totalmente o efeito dos analitos no corpo humano.

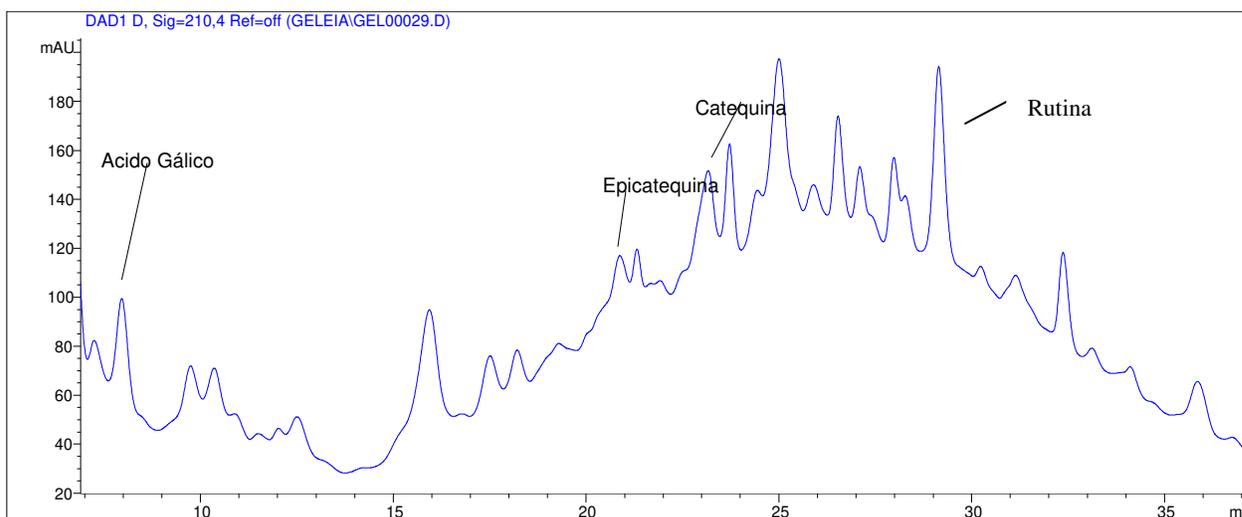
ANEXOS

ANEXO I: Exemplo de Cromatograma dos padrões utilizados para o estudo



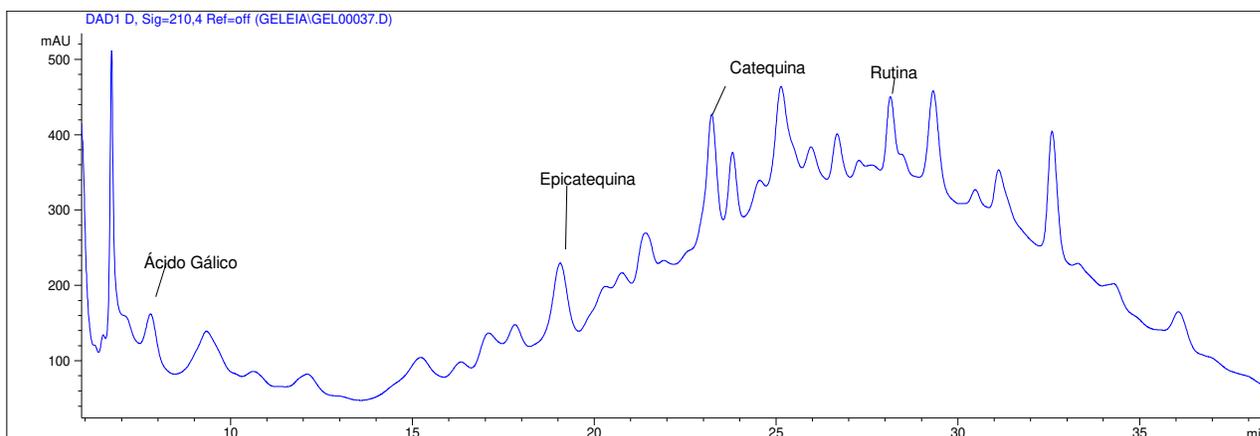
Perfil cromatográfico obtido por meio da análise dos padrões de Ácido gálico, (-)-epicatequina, (+)-catequina, rutina, miricetina, resveratrol e quercetina, em concentração de 10 mg.L^{-1} . Equipamento: Varian 1050 com injetor manual, alça de amostragem de $20 \mu\text{L}$ e bomba ternária, acoplado a um detector de arranjo de diodos (UV-Vis). Coluna: fase reversa, C-18 ODS (250 mm x 4,5 mm) e pré-coluna com o mesmo recheio e diâmetro da coluna. Fase Móvel: ácido orto-fosfórico (1% v/v)(A) e Acetonitrila(B), em fluxo de $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$. Gradiente de eluição: de 0 a 5 minutos, 90%A / 10%B; 5 a 40 minutos, rampa de concentração até atingir 60%A / 40% B; 40 a 45 minutos, rampa de concentração até atingir 90%A / 10%B. Detecção de compostos avaliada em comprimento de onda 210nm.

ANEXO II: Exemplo de cromatograma obtido na análise da formulação de geleia feita com a variedade IAC 138-22, sem adição de cascas secas à formulação.



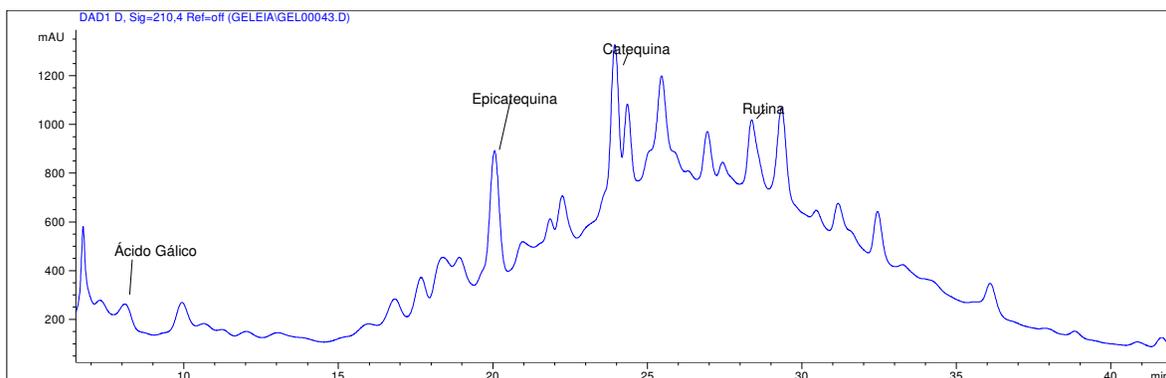
Perfil cromatográfico obtido por meio da análise da formulação de geleia feita com a variedade IAC 138-22, sem adição de cascas secas à formulação. Equipamento: Varian 1050 com injetor manual, alça de amostragem de 20 μ L e bomba ternária, acoplado a um detector de arranjo de diodos (UV-Vis). Coluna: fase reversa, C-18 ODS (250 mm x 4,5 mm) e pré-coluna com o mesmo recheio e diâmetro da coluna. Fase Móvel: ácido ortofosfórico (1% v/v)(A) e Acetonitrila(B), em fluxo de 0,5mL.min⁻¹. Gradiente de eluição: de 0 a 5 minutos, 90%A / 10%B; 5 a 40 minutos, rampa de concentração até atingir 60%A / 40%B; 40 a 45 minutos, rampa de concentração até atingir 90%A / 10%B. Detecção de compostos avaliada em comprimento de onda 210nm.

ANEXO III: Exemplo de cromatograma obtido na análise da formulação de geleia feita com a variedade IAC 138-22, com adição de 3% em massa de cascas secas à formulação.



Perfil cromatográfico obtido por meio da análise da formulação de geleia feita com a variedade IAC 138-22, com adição de 3% em massa de cascas secas à formulação. Equipamento: Varian 1050 com injetor manual, alça de amostragem de 20 μ L e bomba ternária, acoplado a um detector de arranjo de diodos (UV-Vis). Coluna: fase reversa, C-18 ODS (250 mm x 4,5 mm) e pré-coluna com o mesmo recheio e diâmetro da coluna. Fase Móvel: ácido orto-fosfórico (1% v/v)(A) e Acetonitrila(B), em fluxo de 0,5mL.min⁻¹. Gradiente de eluição: de 0 a 5 minutos, 90%A / 10%B; 5 a 40 minutos, rampa de concentração até atingir 60%A / 40% B; 40 a 45 minutos, rampa de concentração até atingir 90%A / 10%B. Detecção de compostos avaliada em comprimento de onda 210nm.

ANEXO IV: Exemplo de cromatograma obtido na análise da formulação de geleia feita com a variedade IAC 138-22, com adição de 6% em massa de cascas secas à formulação.



Perfil cromatográfico obtido por meio da análise da formulação de geleia feita com a variedade IAC 138-22, com adição de 6% em massa de cascas secas à formulação. Equipamento: Varian 1050 com injetor manual, alça de amostragem de 20 μ L e bomba ternária, acoplado a um detector de arranjo de diodos (UV-Vis). Coluna: fase reversa, C-18 ODS (250 mm x 4,5 mm) e pré-coluna com o mesmo recheio e diâmetro da coluna. Fase Móvel: ácido orto-fosfórico (1% v/v)(A) e Acetonitrila(B), em fluxo de 0,5mL.min⁻¹. Gradiente de eluição: de 0 a 5 minutos, 90%A / 10%B; 5 a 40 minutos, rampa de concentração até atingir 60%A / 40% B; 40 a 45 minutos, rampa de concentração até atingir 90%A / 10%B. Detecção de compostos avaliada em comprimento de onda 210nm.