

VANESSA PATRICIA FELICIO DE OLIVEIRA

**Valorização de subprodutos da vinha e do vinho-
composição fenólica e atividade antioxidante**

Orientadora: Professora Doutora Maria Nubélia Silvestre Bravo

UNIVERSIDADE LUSÓFONA DE HUMANIDADES E TECNOLOGIAS

Faculdade de Engenharia

Lisboa

2016

VANESSA PATRICIA FELICIO DE OLIVEIRA

**Valorização de subprodutos da vinha e do vinho-composição
fenólica e atividade antioxidante**

Dissertação defendida em provas públicas para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biotecnológica na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 11/07/2016, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação nº 52/2016, de 1 de Fevereiro, com a seguinte composição:.

Presidente:

Prof.^a Doutora Maria Adília Januário Charmier, ULHT

Vogal:

Prof.^a Doutora Paula Cristina da Silva França Gomes Pereira
Escola de Ciências e Tecnologia da Saúde, ULHT - arguente

Orientador:

Prof.^a Doutora Maria Nubélia Silvestre Bravo, ULHT

UNIVERSIDADE LUSÓFONA DE HUMANIDADES E TECNOLOGIAS

Faculdade de Engenharia

Lisboa

2016

Pedras no caminho?
Guardo todas, um dia vou construir um castelo...

“Fernando Pessoa”

Agradecimentos

Gostaria de expressar a minha gratidão, a todos aqueles que de algum modo tornaram possível a realização deste trabalho.

À Quinta da Plansel, Sociedade Vitivinícola, S.A. pela oferta das amostras.

Ao Diretor do mestrado em Engenharia Biotecnológica da ULHT, onde realizei a parte experimental da minha dissertação, pela possibilidade concedida.

À minha orientadora e professora Nubélia Bravo, por toda a disponibilidade, orientação, dedicação, compreensão e pelo que me ensinou. Um muito obrigado por ter contribuído para a minha aprendizagem e para o meu crescimento, tanto intelectual como pessoal.

À professora Rosário Bronze e ao João Ferreira, pela disponibilidade e ajuda na obtenção de resultados de LC-MS.

À professora Adília Charmier, que esteve sempre disponível.

Aos meus colegas e estagiários, Nádia Mendes, Sónia Vaz e Bavicha Amichande que também contribuíram para este projeto,

À minha colega de mestrado e amiga Sara Padinha pelo companheirismo, simpatia e pelo excelente ambiente de trabalho.

Aos meus pais, e irmão, os grandes responsáveis por tudo. Obrigada pelos sacrifícios, dedicação, paciência e amor. Serão sempre os meus pilares e a força que me faz ultrapassar todos os obstáculos da vida.

Ao João, pelo apoio incondicional que me deu em todos os momentos desta jornada. Um Obrigado pelo amor, amizade e companheirismo.

Obrigado.

Resumo

O bagaço de uva é um resíduo industrial obtido a partir do processo de fabrico de vinho e grande parte do bagaço produzido pelas vinícolas é desperdiçado. Deste modo, é importante explorar subprodutos de vinícolas, como o bagaço, que apresenta propriedades fitoterápicas de importância para as indústrias farmacêuticas, químicas e de alimentos, permitindo assim agregar valor a este resíduo industrial.

O objetivo deste trabalho é determinar a atividade antioxidante usando os métodos DPPH, FRAP e ABTS, além de avaliar o teor em fenóis totais, flavonóides e taninos de subprodutos da vinha e dos vinhos (folha da videira e bagaço de uva), assim como da uva e peles de uva da casta Touriga Nacional. Estas amostras também foram analisadas por espectrometria de massa (MS). Além disso foi também realizada a validação analítica relativamente ao teor em fenóis totais, flavonóides, ABTS e FRAP.

Os resultados obtidos permitiram concluir que os métodos analíticos foram validados com sucesso. De uma forma geral o melhor método de extração de fenóis totais e de flavonóides foi o do Soxhlet de 6 ciclos (D6c), sendo que a amostra com maior concentração de fenóis totais é o bagaço (BV). A amostra com maior concentração em taninos é a pele de uva (P) e a extração pelo método D6c, permite de uma forma geral obter extratos mais concentrados. O vinho A apresenta um teor superior em fenóis totais e taninos do que o vinho B. Usando o método de DPPH conclui-se que a amostra com maior atividade antioxidante foi o extrato P (método A). A amostra com maior atividade antioxidante ao se aplicar o método FRAP é a P (método D6c), enquanto que pelo método de ABTS é a amostra FV (método D6c). Os resultados demonstram uma boa correlação entre o teor em fenóis totais e flavonóides totais para as amostras P, BV e U. Estabeleceu-se a correlação entre os fenóis totais, flavonóides e a actividade antioxidante. Os resultados preliminares de identificação dos compostos por LC-MS conduziram a duas propostas de identificação de compostos (ácido tartárico e catequina em alguns dos extratos analisados) e na detecção de alguns compostos não identificados, nomeadamente com $m/z=133$ e $m/z=341$.

Palavras-chave – Uva, subprodutos, compostos fenólicos, atividade antioxidante, LC-MS, validação

Abstract

The grape pomace is an industrial waste obtained from the production process of wine and the most part of the bagasse produced by wineries is wasted. So it's important to explore wine by-products such as bagasse, which showing important phytotherapeutic properties for pharmaceutical, chemical and food industries, allowing adding value to this industrial waste.

The objective of this study was to determine the antioxidant activity using the methods of DPPH, FRAP and ABTS and evaluating the content of total phenols, flavonoids and tannins from vineyard and wines by-products (vine leaf and grape pomace), as well as grapes and grape skins of Touriga Nacional, these samples were also analyzed by mass spectroscopy (MS).

The results showed that the analytical methods have been successfully validated. In general the best method of extraction of total phenols and flavonoids were the Soxlet 6 cycles (D6c), and the sample with the highest concentration of total phenols is the grape pomace (BV). The sample with the highest concentration in the tannin is grape skin (P) and extraction by D6c method in general allows more concentrated extracts. The wine A has a higher content of total phenols and tannins that the wine B. Applying the DPPH assay concludes that the sample with the highest antioxidant activity was the extract P (method A). The sample with the highest antioxidant activity when applying the FRAP method is the P (D6c method), while by the ABTS method is the sample FV (D6c method). The results show a good correlation between the content of total phenols and total flavonoids to the P BV and U samples. It was established the correlation between total phenols, flavonoids and antioxidant activity. The preliminary results by LC-MS lead to two identification of proposals (tartaric acid and catechin in some of the analyzed extracts) and detection of some unidentified compounds, in particular $m/z = 133$ and $m/z = 341$.

Keywords – Grape, by-products, phenolic compounds, antioxidant activity, LC-MS, validation

Lista de publicações

Vanessa Oliveira, Bavicha Amichande, Nádia Mendes, Sónia Vaz, Nubélia Bravo (2014) - Valorização de subprodutos da vinha e do vinho-composição fenólica e atividade antioxidante, *12º Encontro de Química dos Alimentos*, Portugal.

Lista de abreviaturas e siglas

ABTS	ácido 2,2'-azino-bis(3 - etilbenzotiazolino-6-sulfónico)
AAR	Atividade anti-radical
API	Atmospheric pressure ionization/Ionização à pressão atmosférica
BV	Bagaço de uva
CE	Equivalentes catequina
CV	Coeficiente de variância
DAD	Detetor de Rede de Díodos
DMPD	N,N-dimetil-1,4-fenilenodiamina
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ESI	Ionização por Electrospray (<i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>)
Flav	Flavonóides totais
FRAP	Poder antioxidante de redução do ferro (Ferric reducing antioxidant power)
FV	Folha de videira
GAE	Equivalentes em ácido gálgico
LC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MAE	Extração Microndas assistida
min	Minutos
MS	Espetrometria de massa
P	Peles de uva
rpm	Rotações por minute
SE	Extração Soxhlet
SPE	Extração em fase sólida
SWE	Extração com água superaquecida
TE	Equivalentes Trolox
TP	Teor em fenóis totais
TPTZ	2,4,6- tripiridil-s-triazina
UAE	Extração Ultra-sons
U	Uvas
UV/vis	Ultravioleta-visível

Índice

Introdução	1
1.1 Compostos fenólicos em uvas, vinhos e bagaço de uva	2
1.2 Metodologias de extração e identificação e quantificação	5
1.3. Validação de métodos analíticos.....	13
1.4. Resíduos e subprodutos	14
1.5. Delineamento experimental	16
2. Materiais e Métodos	17
2.1. Reagentes	17
2.3. Equipamento	18
2.4. Análise por Cromatografia líquida de alta eficiência com detetores de díodos e de espectrometria de massa (LC-MS)	19
2.4.1. Equipamento	19
2.4.2. Condições de análise	19
2.5. Preparação de extratos de amostras	20
2.5.1. Método A.....	21
2.5.2. Método B	21
2.5.3. Método C	21
2.5.4. Método D.....	21
2.6. Doseamento do teor em fenóis totais	22
2.7. Teor em Flavonóides Totais	22
2.8. Teor em taninos totais.....	22
2.9. Testes de atividade antioxidante	23
2.9.1. Método DPPH	23
2.9.2. Método FRAP	23
2.9.3. Método ABTS	23
2.10. Validação de métodos	23
2.10.1. Linearidade	23
2.10.2. Determinação do LQ e LD	24
2.10.3. Precisão.....	24
3. Resultados e Discussão	26
3.1. Validação de métodos analíticos.....	26
3.1.1.Doseamento do teor em fenóis totais	26

3.1.2.	Doseamento do teor em flavonóides totais.....	28
3.1.3.	Método de FRAP	30
3.1.4.	Método de ABTS.....	33
3.2.	Análise e comparação de extratos naturais de subprodutos da vinha e do vinho	35
3.3.	Identificação de compostos nos extratos dos subprodutos por LC-MS.....	45
4.	Considerações finais e perspectivas futuras.....	51
4.1.	Considerações finais	51
4.2.	Perspetivas futuras	53
5.	Referências Bibliográficas	54
Anexo A.....		57
Anexo B.....		59

Índice de tabelas

Tabela 1. Programa de eluentes usados na análise por LC-MS	20
Tabela 2. Parâmetros da regressão linear	27
Tabela 3. Limites de detecção e de quantificação obtidos no método Folin-Ciocalteu	27
Tabela 4. Exatidão no método Folin-Ciocalteu	28
Tabela 5. Parâmetros da regressão linear no doseamento do teor em flavonóides	29
Tabela 6. Limites de detecção e de quantificação obtidos no doseamento do teor em flavonóides	30
Tabela 7. Exatidão no método do teor em flavonóides totais	31
Tabela 8. Parâmetros da regressão linear no método de FRAP	32
Tabela 9. Limites de detecção e de quantificação obtidos no método de FRAP	32
Tabela 10. Exatidão dos padrões e amostras no método de FRAP	33
Tabela 11. Parâmetros da regressão linear no método ABTS	34
Tabela 12. Limites de detecção e de quantificação obtidos no método de ABTS	35
Tabela 13. Exatidão dos padrões e amostras doseamento do teor em flavonóides	36
Tabela 14. Teor em Fenóis totais (mg GAE.L ⁻¹), para os diferentes extratos	36
Tabela 15. Teor em Flavonóides (mg/L), para os diferentes extractos	37
Tabela 16. Teores em taninos (mg/L), para os diferentes extratos	37
Tabela 17. Valores de DPPH (%), para os diferentes extratos	38
Tabela 18. Teor em trolox (mg.L ⁻¹), para os diferentes extratos usando o método de FRAP	38
Tabela 19. Teor em trolox (mg.L ⁻¹), para os diferentes extratos usando o método de ABTS	39
Tabela 20. Correlação (R) entre várias variáveis para as amostras em estudo	42
Tabela 21. Correlação (R) entre FRAP, ABTS e DPPH para os vários métodos e amostras em estudo	43
Tabela 22. Correlação (R) entre ABTS e DPPH para os vários métodos e amostras em estudo	44

Índice de figuras

Fig. 1. Estrutura do ácido hidroxicinâmico (a) e hidroxibenzóico (b)	2
Fig. 2. Estrutura de flavonóides: a – Flavona R3 = H; Flavonol R3 = OH; b – Flavanona R3 = H; Flavanonol R3 = OH	3
Fig. 3. Reação da vanilina com o 3-flavanol monomérico produzindo um aducto vermelho com absorvância máxima a 500 nm.	7
Fig. 4. Representação esquemática de um espectrómetro de massas	8
Fig. 5. Princípio de poder de redução férrica.	12
Fig. 6. Amostras	20
Fig. 7. Método A (Infusão)	21
Fig. 8. Método B	21
Fig. 9. Método C (Meio acidificado)	21
Fig. 10. Método D (Soxhlet)	22
Fig. 11. Absorvância em função das concentrações entre 0.4 mg/L e 6.0 mg/L em ácido gálico	26
Fig. 12. Distribuição residual em torno de zero para a linearidade do método Folin-Ciocalteu	27
Fig. 13. Absorvância em função das concentrações entre 35 mg/mL e 150 mg/mL em catequina	29
Fig. 14. Distribuição residual em torno de zero para a linearidade doseamento do teor em flavonóides	29
Fig. 15. Linearidade no método de FRAP	31
Fig. 16. Distribuição residual em torno de zero para a linearidade do método de FRAP	31
Fig. 17. Linearidade no método de ABTS	33
Fig. 18. Distribuição residual em torno de zero para a linearidade do método de ABTS	34
Fig. 19. Teor em fenóis totais (A), flavonóides totais (B) e taninos (C) das amostras de vinho A e B	39
Fig. 20. Atividade antioxidante FRAP (A), ABTS (B) e DPPH (C) das amostras de vinho A e B	40
Fig. 21. Relação entre o teor em flavonóides totais e o teor em fenóis totais das amostras U, P e BV	41

Fig. 22. Correlação entre o teor em fenóis totais e o teor em flavonóides para os métodos C e D3c	43
Fig. 23. Correlação entre método FRAP e DPPH para o método A	44
Fig. 24. Cromatogramas de corrente iónica total (TIC) para o extrato de bagaço (BV) tendo em conta os métodos de extracção B, C e D6c	45
Fig. 25. Cromatogramas de corrente iónica total (TIC) para o extrato de folha de videira (FV) tendo em conta os métodos de extracção B e C	46
Fig. 26. Cromatogramas de corrente iónica total (TIC) para o extrato de peles de uva (P) tendo em conta os métodos de extracção A e B	46
Fig. 27. Cromatogramas de corrente iónica total (TIC) para o extrato de peles de uva (P), folha de videira (FV) e bagaço (BV) tendo em conta o método de extracção B	47
Fig. 28. Cromatograma do extrato P para $m/z= 149$	48
Fig. 29. Cromatograma do extrato P para $m/z= 133$ e 179	48
Fig. 30. Cromatograma do extrato BV para $m/z= 341$ e 381	49
Fig. 31. Cromatograma do extrato FV para $m/z= 289$ (A) e espectro de absorção (B)	49
Fig. 32. Cromatograma do extracto BV obtido pelo método C e fases móveis diferentes (A) ácido fórmico a 0.5% e (B) ácido acético a 0.1%	50

Introdução

Touriga Nacional é uma casta de uva tinta da família das *Vitis Vinifera* originária de Portugal.

Entre as várias castas tintas é a casta mais nobre de Portugal. É a rainha das uvas portuguesas e que pelas suas qualidades para a vinificação, começa a ocupar cada vez mais espaço nas produções europeias, australianas e californianas.

O bagaço de uva é um resíduo industrial obtido na produção de vinho e é composto pela grainha, casca e engaço da uva. Os compostos presentes na uva, como resveratrol, ácido linoleico, ácido palmítico, entre outros, permanecem no bagaço em maior ou menor quantidades, dependendo do processo utilizado. Grande parte do bagaço, produzido pelas vinícolas, é desperdiçado. Deste modo, é importante explorar subprodutos de vinícolas, como o bagaço, que apresenta propriedades fitoterápicas de importância para as indústrias farmacêuticas, químicas e de alimentos, permitindo assim agregar valor a este resíduo industrial [1].

Segundo *Riccardo Flamini et al* (2013) a uva é qualitativa e quantitativamente muito rica em polifenóis. Em particular, antocianinas, flavonóis e derivados de estilbenos que desempenham papéis muito importantes no metabolismo, graças às suas características peculiares. As antocianinas são responsáveis pela cor de uvas tintas e vinhos tintos, conferindo características organolépticas ao vinho. Estão a ser utilizadas para estudos quimiotaxonómicos e na avaliação do estágio de maturação polifenólica de uva. São corantes naturais, têm atividade antioxidante, antimicrobiana e anticarcinogénica, exercem efeito protetor sobre o sistema cardiovascular humano, e são utilizados na comida e indústrias farmacêuticas.

Estilbenos são fitoalexinas presentes nos bagos de uva e estão associados aos efeitos benéficos do vinho. O principal estilbeno é o resveratrol, que é caracterizado por ser anticancerígeno, antioxidante, anti-inflamatório e cardioprotector. Dímeros de resveratrol também ocorrem em uva, e são sintetizados pela videira como defesa ativa contra ataque exógeno, ou produzidos por enzimas extracelulares libertados por patogénicos na tentativa de eliminar compostos tóxicos indesejáveis.

Flavonóis são uma classe omnipresente dos flavonóides com foto-proteção e copigmentação (juntamente com antocianinas). A falta de expressão da enzima flavonóide 3', 5'-hidroxilase nas uvas brancas restringe a presença de quercetina, caempferol e derivados isoramnetina, enquanto as uvas tintas geralmente também contêm miricetina, laricitrina e derivados de siringetina. Nos últimos dez anos, o desenvolvimento tecnológico da instrumentação analítica, particularmente espectrometria de massa, conduziu a grandes melhorias e uma maior conhecimento da química destes compostos [2].

1.1 Compostos fenólicos em uvas, vinhos e bagaço de uva

São diversas as fontes antioxidantes naturais conhecidas na natureza, sendo algumas amplamente encontradas no reino vegetal. O seu poder antioxidante poderá ser atribuído ao conteúdo em compostos fenólicos [3].

Os compostos fenólicos presentes nas plantas são sintetizados tipicamente durante o seu desenvolvimento como mecanismo de proteção contra condições adversas tais como lesões dos tecidos, infeções e radiação UV. A sua estrutura base apresenta um anel aromático ao qual pode estar ligado um grupo hidroxilo (fenóis) ou vários (polifenóis), o que origina uma grande diversidade de compostos. Os compostos fenólicos podem ser divididos em várias classes, destacando-se os ácidos fenólicos, flavonóides e taninos, como antioxidantes fenólicos mais disseminados na natureza. [4]. Os ácidos fenólicos que ocorrem naturalmente nas plantas são constituídos por dois grupos, os ácidos hidroxibenzóicos (Fig.1.) e seus derivados (com estrutura comum C6-C1) e os ácidos hidroxicinâmicos (Fig.1.) e seus derivados, com estrutura base C6-C3. Os flavonóides apresentam estrutura base C6-C3-C6, formada por dois anéis fenólicos ligados entre si através de um anel pirano [5] [6].

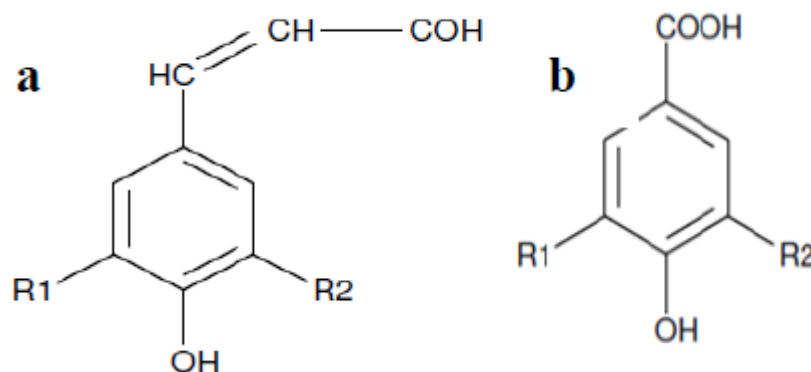


Fig. 1. Estrutura do ácido hidroxicinâmico (a) e hidroxibenzóico (b)

A divisão dos compostos fenólicos pode ainda ser feita em dois grandes grupos: pouco distribuídos na natureza e amplamente distribuídos na natureza. De um modo geral, pertencem ao primeiro grupo os fenóis simples, enquanto no segundo grupo são incluídos todos os compostos fenólicos (e.g. ácidos fenólicos, flavonóides e taninos) presentes no reino vegetal [7].

Os compostos fenólicos são considerados antioxidantes e podem ser incluídos na categoria de inibidores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da auto-oxidação. Os flavonóides e os ácidos fenólicos são os que mais se destacam do grupo dos compostos fenólicos [8] [9] [10]. A eficiência antioxidante é determinada pelos grupos funcionais presentes e pela posição que ocupam no anel aromático, bem como pelo tamanho da cadeia desses grupos [8] [11].

Os flavonóides são pigmentos de coloração amarela que se caracterizam por um esqueleto comum do tipo C6-C3-C6, consistindo em dois anéis fenólicos unidos por um anel pirano heterocíclico. Esta estrutura (Fig. 2.) pode ocorrer como derivado de um núcleo de 2-fenil cromona por um lado, originando flavonas (a- $R_3 = H$) e flavonóis (a - $R_3 = OH$), e como derivado de um núcleo de 2-fenil cromanona por outro lado, originando flavanonas (b - $R_3 = H$) e flavanonóis (b - $R_3 = OH$) [12] [13] [14].

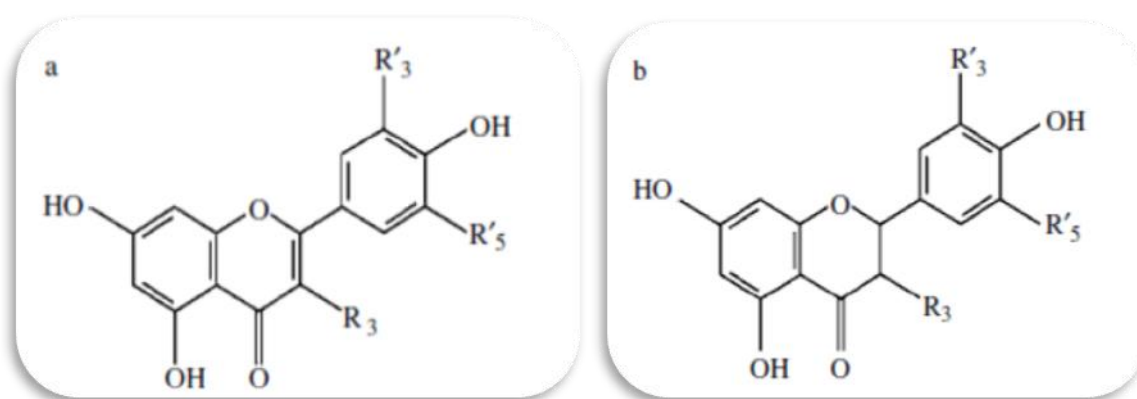


Fig. 2. Estrutura de flavonóides: **a** – Flavona $R_3 = H$; Flavonol $R_3 = OH$;
b – Flavanona $R_3 = H$; Flavanonol $R_3 = OH$

Os flavonóides predominantes no vinho são, os flavonóis. Entre eles destacam-se o campferol, a quercetina e a miricetina, sendo que os três compostos se encontram no vinho tinto, mas apenas os dois primeiros se encontram no vinho branco [13].

Os taninos estão presentes principalmente nas partes sólidas do cacho da uva – película, grainhas e engaços - que são extraídos durante a vinificação [15]. Uma vez que estão

localizadas quase que exclusivamente nas partes sólidas do cacho (películas, grainhas e engaços), a sua transferência para o mosto e vinho é determinada principalmente pelo grau de maceração durante o processo de vinificação. Polímeros com maior peso molecular difundem mais lentamente do que aqueles de menor peso molecular.

O vinho possui uma elevada quantidade de compostos com características antioxidantes, a maior parte deles provenientes da uva [12] [13] [14]. No entanto, os métodos de vinificação aplicados, nomeadamente, o tempo de maturação em cascos de carvalho e a possível adição de sulfitos para conservação do vinho, podem contribuir para a presença de outras substâncias com carácter antioxidante.

Os compostos antioxidantes que se destacam no vinho são os compostos fenólicos, que se caracterizam por possuírem anéis aromáticos e grupos hidroxilo, sendo denominados por fenólicos quando possuem apenas um anel aromático e por polifenólicos quando possuem mais do que um anel aromático [13] [14]. Os compostos fenólicos podem ainda ser separados em duas categorias: os flavonóides e não-flavonóides [12].

Rockenbach et al (2010) verificaram que as grainhas apresentavam um teor em compostos fenólicos (2.128 a 16.518 mg de equivalentes de catequina (CE)/100g) superior ao das peles de uvas tintas (660 a 1839 mg de CE/100g). Relativamente à atividade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP as grainhas da variedade *Pinot Noir* apresentam valores de 16.925 μmol equivalentes de Trolox (TE)/100g e 21.492 $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ /100 g respectivamente, superiores aos obtidos para os extratos de pele uva da variedade *Isabel* (3640 $\mu\text{mol TE}$ /100 g e 4362 $\mu\text{mol de Fe}^{2+}$ /100g, respectivamente). Compostos oligoméricos e flavanóis poliméricos foram detetados neste tipo de extractos que podem ser aplicados em produtos como agentes antioxidantes [16].

Um estudo comparativo efetuado a diferentes castas portuguesas (*Touriga Nacional*, *Touriga Franca* e *Tinta Roriz*) verifica que a casta *Touriga Nacional*, apresenta valores elevados relativamente ao teor em fenóis totais ($142.4 \pm 1.1 \text{ mg GAEg}^{-1}$ resíduo seco), ao DPPH ($1.12 \pm 0,04 \text{ mmol TEG}^{-1}$ resíduo seco) e ao ORAC ($1579 \pm 244 \text{ mol TEG}^{-1}$ resíduo seco). Ácido gálgico, ácido cafeico, ácido sirínico, (+) - catequina e (-) – epicatequina foram identificados neste tipo de amostras [17].

O vinho é considerado um alimento funcional pois contém componentes que exercem efeitos benéficos para a saúde do consumidor desde que ingeridos em doses fisiologicamente equilibradas [18].

Os benefícios do vinho estão relacionados com o seu teor em compostos polifenólicos e as suas propriedades antioxidantes.

Os compostos antioxidantes são capazes de proteger os sistemas biológicos contra a ação prejudicial dos radicais livres. Evidências epidemiológicas indicam que o consumo de alimentos e bebidas ricas em antioxidantes, reduz a incidência de várias doenças degenerativas, tais como mutagénese, carcinogénese, arteriosclerose, doença cardíaca isquémica, doenças neurodegenerativas e do envelhecimento.

Para além do seu efeito benéfico sobre a saúde, os antioxidantes são utilizados em várias indústrias. Na indústria alimentar, por exemplo, eles são utilizados para prevenir a oxidação de lípidos e outros componentes e para preservar a qualidade do alimento. O vinho ou os subprodutos, são considerados uma fonte rica de fitoquímicos naturais e particularmente adequados para utilização em ingrediente em alimentos, medicamentos e cosméticos.

É de interesse comercial ser capaz de determinar a atividade antioxidante do vinho e subprodutos derivados de vinhos [19].

1.2 Metodologias de extração e identificação e quantificação

A preparação das amostras implica a extração dos compostos em estudo a partir de matrizes, sólidas ou líquidas, seja para obter o composto num estado mais puro, seja também a concentração dos compostos, caso se justifique [20].

As extrações com solventes são o procedimento mais utilizado na preparação de amostras de fontes naturais. Vários factores influenciam este tipo de extração, nomeadamente o tempo de extração, a temperatura e a agitação da amostra. O tempo de extração varia em função da matriz, do seu estado de divisão, da natureza dos compostos a extrair, do solvente e da aplicação ou não de temperatura e/ou agitação. O aumento da temperatura pode provocar um aumento da solubilidade de alguns compostos presentes na matriz, por isso a utilização de uma temperatura superior à temperatura ambiente aumenta nessa situação o rendimento do processo extrativo. No entanto temperaturas elevadas nem sempre podem ser aplicadas, devido à instabilidade de muitos compostos a essas temperaturas. A agitação pode diminuir o tempo gasto num processo extrativo, pois este processo depende de fenómenos de difusão e a renovação do solvente em contato com a matriz influencia a velocidade da difusão.

A preparação da amostra pode compreender também um passo de purificação prévia utilizando a extração em fase sólida (SPE). Esta técnica é vantajosa, porque além de não se usar grandes quantidades de solvente orgânico, não existe a formação de emulsões. Vários

fatores influenciam o rendimento da extração SPE, como o tipo de solvente e o estado de divisão da matriz. A escolha do solvente é feita tendo em conta a dissolução dos compostos, assim como a facilidade com que se pode isolar o composto extraído, isto é, o baixo ponto de ebulição do solvente para sua posterior evaporação. A matriz sólida deve estar finamente dividida, de forma a existir maior contacto entre o solvente e a amostra [21].

A extração com água superaquecida (SWE) é uma técnica que utiliza água à temperatura de 100°C a 374°C e uma pressão elevada, o suficiente para manter a água no estado líquido. O que implica a diminuição da polaridade da água e o aumento da solubilidade dos compostos orgânicos. Este método, que é uma alternativa para a extração de componentes voláteis, é mais limpo, rápido e barato que os métodos de extração convencionais [22].

O método de Soxhlet é um processo contínuo, e é bastante útil nos casos em que o composto puro é parcialmente solúvel num solvente e os compostos indesejáveis não. A eficiência do método de Soxhlet, depende dos seguintes aspetos: i) natureza do material a ser extraído; ii) polaridade do solvente; iii) ligação dos lípidos com outros compostos; iv) passagem do solvente pela amostra; v) tamanho das partículas da amostra; vi) humidade da amostra; vii) velocidade de refluxo e viii) quantidade relativa de solvente [23]. O equipamento que se aplica neste método utiliza refluxo de solvente num processo intermitente. A amostra não fica em contato com o solvente muito quente, porém ocorre uma utilização excessivo de solvente, pois o volume total deve ser suficiente para atingir o sifão.

Drosou et al (2015) obtiveram óleo de bagaço através de três métodos diferentes de extração (microondas assistida (MAE), ultra-sons (UAE) e extração de Soxhlet (SE) utilizando água, água: etanol (1: 1) e etanol como solventes. A eficiência e a seletividade dos processos de extração foram determinados em termos de rendimento de extração, atividade anti-radical (AAR) e teor em fenóis totais (TP). Os extratos obtidos pelo método UAE com o solvente água:etanol apresentam valores elevados para o teor em fenóis totais elevado (438984 ± 4.034 mg/L GAE no extrato seco) AAR (0.36 ± 0.01 para 0.96 ± 0.02 mg /mL [24].

O método de Folin-Ciocalteu, também conhecido como o método de quantificação dos fenóis totais presentes na amostra, baseia-se na acção redutora dos compostos fenólicos, em meio alcalino, sobre uma mistura dos ácidos fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), com obtenção de óxidos de tungsténio (W_8O_{23}) e de molibdéio (Mo_8O_{23}), que apresentam uma coloração azul. A monitorização da reação é realizada por colorimetria uma vez que o complexo reduzido apresenta uma coloração azul intensa e absorvância máxima ao comprimento de onda de 750nm. Desta forma, quanto maior for o teor em compostos

fenólicos presentes na amostra, maior será a absorvância a este comprimento de onda [25] [26] [27].

O método de quantificação de flavonóides baseia-se numa reacção de complexação entre o flavonóide e o cloreto de alumínio em meio alcalino formando-se um composto avermelhado com absorvância máxima a 510 nm [28].

O método de quantificação dos taninos é específico para uma classe limitada de compostos que apresentam uma ligação simples na posição 2,3 e grupos hidroxila em posições alternadas no anel A. leucoantocianidinas (catequinas) e proantocianidinas (taninos) reagem com a vanilina na presença de HCl para produzir um produto de condensação vermelho, como demonstrado na fig. 3 [29].

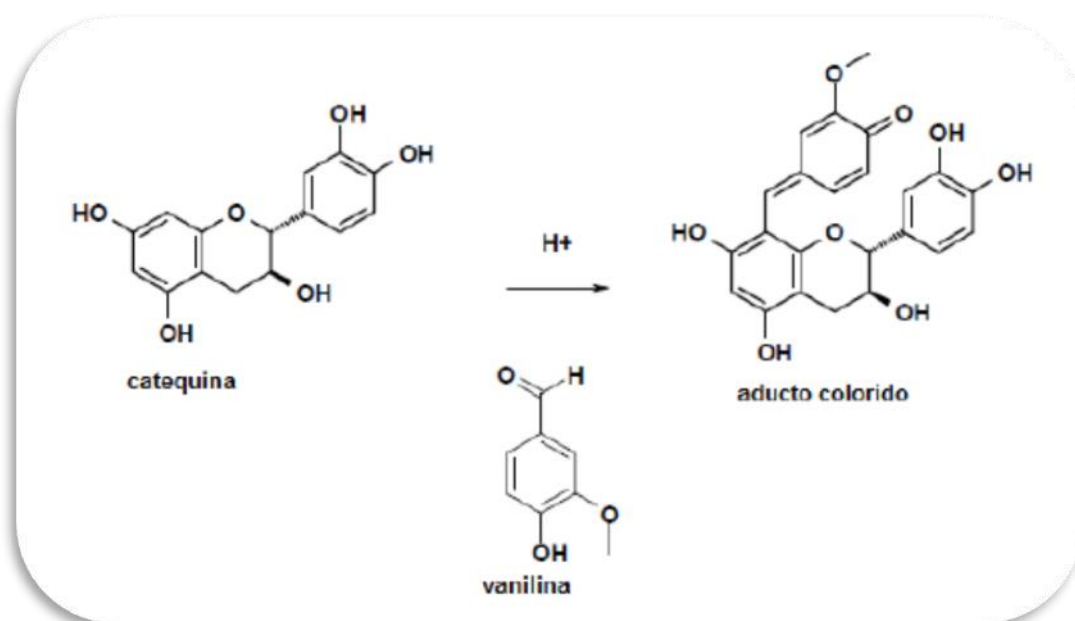


Fig. 3. Reação da vanilina com o 3-flavanol monomérico produzindo um aducto vermelho com absorvância máxima a 500 nm

Em sistemas biológicos, um antioxidante é uma substância com capacidade de reduzir eficazmente um pro-oxidante, com formação simultânea de produtos com baixo ou nenhum nível de toxicidade [31]. Em 1995, Halliwell e colaboradores sugerem uma definição generalista para os antioxidantes: (“qualquer substância que mesmo estando presente em baixas concentrações quando comparada com o substrato oxidável, apresenta capacidade para atrasar ou inibir de forma eficaz esse substrato”). As substâncias pró-oxidantes, por sua vez,

apresentam capacidade de induzir danos oxidativos em diferentes alvos biológicos, ácidos nucleicos, lípidos e proteínas [32].

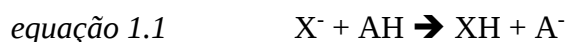
A oxidação nos sistemas biológicos ocorre devido à ação dos radicais livres no organismo. Os radicais livres são espécies químicas com um eletrão desemparelhado, o que lhes confere grande afinidade eletrónica e, portanto, grande reatividade. A formação de radicais livres pode dever-se a processos endógenos – processos bioquímicos associados ao metabolismo; ou a processos exógenos – reações metabólicas provocadas pela exposição a agentes externos ao organismo [33].

O desequilíbrio entre espécies antioxidantes e pro-oxidantes nos sistemas biológicos é definido como *stress* oxidativo que tem como consequências um aumento intracelular de espécies reativas.

Muitos alimentos que fazem parte da dieta quotidiana são ricos em antioxidantes que promovem a prevenção e/ou redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Os antioxidantes podem ter ação direta na neutralização das ações dos radicais livres ou participar indiretamente nos sistemas enzimáticos com essa função [34] [35].

O uso de antioxidantes é vulgar na indústria alimentar, com vista a prevenir ou retardar a deterioração oxidativa (aumentando o tempo de vida útil), e manter o valor nutricional dos alimentos [36] [37].

Os métodos que avaliam a capacidade antioxidante por transferência de átomo de hidrogénio baseiam-se na inibição (por ação de um antioxidante - AH) dos radicais livres (X•) através da doação hidrogénio (*equação 1.1*) [25].



A deteção da capacidade de um antioxidante transferir um eletrão para reduzir compostos é avaliada pelos métodos de transferência de eletrão, descrito pela *equação 1.2*. Entre os métodos utilizados para determinar a capacidade antioxidante por esta reação evidenciam-se os seguintes métodos: i) ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína)-6-sulfónico); ii) FRAP (poder redutor férrico); iii) capacidade de redução do Cu (II); iv) DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) e o método DMPD (N,N-dimetil-1,4-fenilenodiamina) [25][38].



As reações por transferência de eletrões ocorrem, geralmente, de forma mais lenta que as reações por transferência de átomos de hidrogénio [25].

O método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é baseado na medida da capacidade antiradicalar de um composto face ao radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]). Por ação de um composto antioxidante o radical DPPH[•] é reduzido passando à sua forma estável DPPH-H (difenil-1-picril-hidrazina). Esta reação é monitorizada pela alteração de cor violeta (DPPH[•]) para amarelo (DPPH-H), seguida por medida da absorvância a 517 nm, até ser atingido um patamar. A atividade do composto antioxidante (RH) medida neste teste está relacionada com a capacidade de doar um H, ou seja do número de grupos que contêm átomos de hidrogénio lábeis como é o caso dos grupos hidroxilo.

O método DPPH é um dos métodos mais utilizados porque, em termos gerais, é simples, eficiente e barato, é largamente utilizado como um ponto de referência. Quanto maior for a capacidade de eliminação de radicais livres de um composto antioxidantes, maior a redução de DPPH e a cor púrpura fica menos persistente na amostra [19].

A capacidade antioxidante da amostra pode ser apresentada sob a forma de percentagem de inibição do radical (I), após um determinado tempo de reação. Isto é

$$\text{Equação 1.3.} \quad I = 100 \times \frac{Ab - Aa}{Ab}$$

onde Ab é o valor de absorvância do tempo zero e Aa é o valor de absorvância da amostra para um dado tempo de reação.

Ao substituir a amostra por quantidades conhecidas de um padrão, é possível calcular as percentagens de inibição do radical por parte desse padrão de modo a construir retas de calibração, e apresentar os resultados, não sob a forma de percentagem de inibição, mas sob a forma de equivalentes desse padrão.

Uma das desvantagens deste método é o facto de utilizar um radical sintético, e portanto sem grande relevância biológica. No entanto, trata-se de um ensaio simples, pouco dispendioso e rápido, e por isso largamente difundido no âmbito da caracterização da atividade antioxidante de diversas matrizes [25] [26] [27] [38].

O método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico) permite avaliar a atividade antioxidante de uma amostra através da sua capacidade em reduzir radicais catiões ABTS^{•+}. Ao juntar na mistura reacional persulfato de potássio ao ABTS, este último é oxidado ao catião ABTS^{•+}, que possui uma coloração azul escuro com máximos de absorvância aos comprimentos de onda 415, 645, 734 e 815 nm. Ao adicionar substâncias

antioxidantes à mistura, o catião $ABTS^{•+}$ é reduzido a ABTS, fazendo com que se dê a descoloração da solução inicial. Uma vez esgotados os antioxidantes no meio reacional, o ABTS volta a ser oxidado a $ABTS^{•+}$, regressando à coloração azul da solução. A extensão da reação de descoloração que ocorre durante um determinado período de tempo, geralmente monitorizada a 415 nm, depende diretamente da capacidade antioxidante da amostra. Quando se aplicam as mesmas condições reacionais a um padrão, é possível apresentar a capacidade antioxidante da amostra sob a forma de equivalente desse padrão.

Ao considerar os radicais sintéticos, ou seja o DPPH[•] e o $ABTS^{•+}$, a transferência do próton pode ser imediata ou não. No primeiro caso, ocorre a homólise do antioxidante protonado originando um radical de hidrogénio que irá reagir com o radical, dando origem ao radical protonado, ou seja neutralizado, e a produtos derivados do antioxidante que reagiu. No segundo caso, existe uma dissociação do antioxidante protonado, originando, em solução, um próton e o antioxidante desprotonado. Este antioxidante desprotonado reage em seguida com o radical, surgindo produtos derivados do antioxidante que reagiu, juntamente com o radical desprotonado. Finalmente, o radical desprotonado reage com o próton que tinha sido libertado previamente, dando origem ao radical protonado [25] [26] [27] [38].

O método de FRAP (Ferric reducing antioxidant power) baseia-se na redução, em meio ácido, de um complexo férrico de TPTZ (2,4,6- tripiridil-s-triazina) a um complexo ferroso de TPTZ com uma forte coloração azul escura (azul prússia). Quanto maior for a capacidade antioxidante da amostra, maior será a produção do complexo ferroso de TPTZ, podendo ser monitorizado através da leitura da absorvância a um comprimento de onda de 593 nm (Fig. 5) [25] [26] [27] .

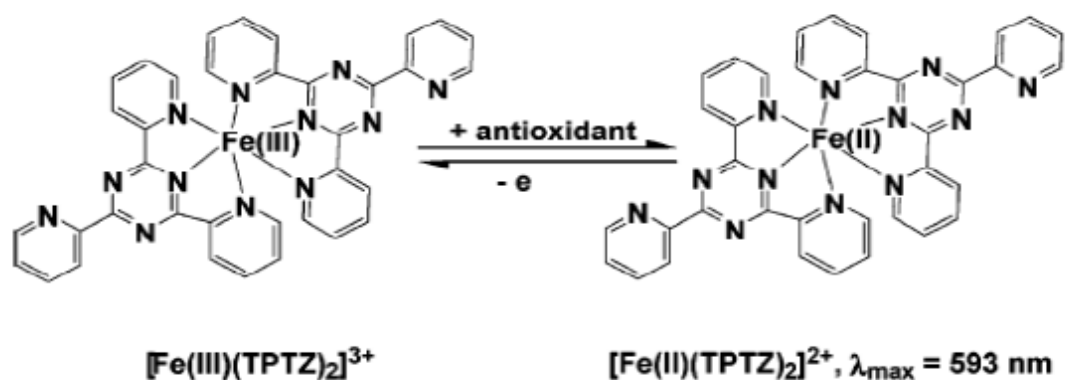


Fig 5. Princípio de poder de redução férrica.

A obtenção de retas de calibração faz-se através da substituição da amostra por concentrações conhecidas de padrões contendo ferro no estado reduzido, nomeadamente sulfato ferroso (FeSO_4) ou padrões de um antioxidante, sendo a capacidade redutora expressa em equivalentes de iões ferrosos ou equivalentes desse composto antioxidante. Uma das limitações desta técnica consiste no facto de apenas avaliar a capacidade da amostra em reduzir iões férricos e não a sua capacidade em neutralizar radicais livres ou outras espécies antioxidantes. No entanto, trata-se de um ensaio simples, reproduzível e pouco dispendioso, quando comparado com outros métodos de avaliação da atividade antioxidante.

A espectrometria de massa é uma técnica analítica que permite a identificação da composição química de um determinado composto isolado, ou de diferentes compostos em misturas complexas, através da determinação de suas massas moleculares na forma iónica, baseada na sua movimentação através de um campo eléctrico ou magnético. Esta movimentação é determinada pela razão entre a massa de um determinado composto (analito) e sua carga, designada por m/z . Conhecendo o valor de m/z de uma molécula é possível inferir a sua composição química elementar, e com isso determinar a sua estrutura [30].

A espectrometria de massas pode ser utilizada em análises quantitativas, mas é em análises qualitativas que ela se destaca, como na identificação de compostos em misturas e, principalmente, na caracterização estrutural de compostos desconhecidos, que pode ser alcançado através da formação de iões-molécula e de seus respectivos iões fragmentos.

Então a espectrometria massas fornece informações precisas sobre a massa dos compostos analisados.

Na realidade um espectrómetro de massas fornece a massa obtida apenas de iões entretanto nem todas as moléculas contêm grupos químicos naturalmente carregados.

Noutros processos de ionização dependendo das características químicas das moléculas a serem analisadas, pode-se obter ião protonados, comuns em moléculas contendo grupos R-NH_2 , ou então ião desprotonados, como no caso de moléculas que apresentam grupos ácidos (R-COOH) nas suas estruturas. Nestes dois casos os iões são chamados de iões quasi-moleculares [31].

A espectrometria de massas também é utilizada na determinação de razões isotópicas.

Um espectrómetro de massas é composto por 3 módulos principais: fonte de iões, analisadores de massas e os detectores (Fig. 4), em que

- Fontes de iões: responsável pelo processo de ionização das moléculas, ou seja, transformação de moléculas neutras em iões;
- Analísadores de massas: responsável pela separação dos iões de acordo com seu m/z , realizado através de aplicações de campos elétricos e magnéticos;
- Detectores: responsável pela detecção e amplificação dos iões [30].



Fig. 4. Representação esquemática de um espectrómetro de massas

Os processos de ionização são fundamentais para a espectrometria de massa, diversas fontes de ionização foram desenvolvidas ao longo da sua história. No entanto apenas se descreve a ionização por *spray* de electrões (ESI-*Electrospray Ionization*) por ter sido a utilizada neste trabalho.

ESI é uma das principais técnicas de ionização em pressão atmosférica (API – atmospheric pressure ionization) e também uma das mais importantes na determinação estrutural de diversas moléculas biológicas, consistindo em mais uma das técnicas no conceito de ionização suave, permitindo a formação de ião a partir de macromoléculas, superando sua propensão em fragmentar-se quando ionizadas.

O processo de ionização por ESI ocorre quando um solvente volátil contendo os analitos é bombeado através de um fino capilar de aço inoxidável. Uma alta tensão é aplicada à ponta deste capilar, e como consequência deste forte campo eléctrico, a amostra que sai pelo capilar estará dispersa em um aerosol composto por gotículas de solvente e analito altamente carregadas.

Este processo é auxiliado por um gás inerte (geralmente azoto designado como gás de nebulização) que é introduzido na fonte ESI, fluindo externamente ao capilar. Este fluxo de gás está em temperaturas elevadas (150-200 °C) e auxilia na evaporação do excesso solvente e na formação do aerosol.

1.3. Validação de métodos analíticos

Para garantir que os métodos analíticos originem resultados confiáveis e interpretáveis deve-se fazer a sua validação, ou seja a validação de um método analítico permite demonstrar que o método é adequado para o fim proposto. Num processo de validação de método analítico devem ser considerados para validação os parâmetros: i) especificidade; ii) linearidade; iii) exatidão; iv) precisão; v) limites de detecção e quantificação e vi) robustez.

Os parâmetros de validação são aplicados ou não consoante o tipo de procedimento analítico.

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, dentro de uma determinada faixa de concentração.

O limite de detecção consiste na menor concentração que permite identificar com fiabilidade a presença de um composto, enquanto que o limite de quantificação consiste na menor concentração do composto que um determinado ensaio tem capacidade de quantificar com exatidão e precisão pretendida. [39]

O cálculo dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) é realizado através das seguintes equações:

$$\text{Equação 1.4.} \quad LD = \frac{3s}{S}$$

$$\text{Equação 1.5.} \quad LQ = \frac{10s}{S}$$

onde s é a estimativa do desvio-padrão do branco e S é a inclinação da reta de calibração.

A Precisão é uma medida da reprodutibilidade de um resultado.

Na determinação da precisão intermédia calcula-se o coeficiente de variância (C_v) através da *equação 1.6* e o valor obtido deverá ser $< 2\%$:

$$\text{Equação 1.6} \quad C_v = \frac{100 \times DP}{méd\bar{a}}$$

A exatidão refere-se a quão próximo um valor de uma medida está do “valor real” e é calculada através da *equação 1.7* [39][40]

$$\text{Equação 1.7.} \quad \text{Exatidão} = \frac{\text{concentração obtida}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \text{ (\%)}$$

1.4. Resíduos e subprodutos

São diversos os produtos secundários obtidos após a produção de vinho, sendo o bagaço o principal subproduto da vinificação, não só pela sua riqueza alcoólica e tartárica, mas também pelo interesse económico de alguns dos seus componentes físicos.

O bagaço, é o produto resultante da prensagem das massas vínicas, constituídas pelas partes sólidas das uvas e pelo mosto ou pelo conjunto mosto/vinho que as embebe.

Cerca de 85% das uvas produzidas em Portugal destinam-se à elaboração de vinhos de mesa, espumosos e sumos. O resíduo da prensagem (bagaço) representa 12 a 15% em peso da matéria-prima inicial e contém restos de açúcar, outros glúcidos, proteínas e, nas grainhas, um teor elevado de lípidos, que enriquecem altamente o bagaço, justificando que o calor de combustão deste produto seja mais elevado que o da madeira.

Podemos ter dois tipos de bagaço, consoante a tecnologia utilizada no fabrico do vinho. São eles:

a) O bagaço doce ou fresco – é o bagaço que provém da elaboração de vinhos de “bica aberta”. Não fermenta com os mostos, contendo essencialmente líquido açucarado e pouco ou nenhum álcool. Assim, antes de submeter os bagaços brancos à destilação, torna-se indispensável deixá-los fermentar, a fim de que haja transformação do açúcar em álcool.

b) O bagaço tinto ou fermentado – é aquele que provém da vinificação com maceração. O mosto é fermentado em contacto com as partes sólidas, estas, depois de prensadas, contêm uma certa quantidade de vinho e, por consequência, de álcool.

A composição química dos bagaços está relacionado com o tipo de bagaço, a natureza das castas de que provém, o modo de vinificação, as condições atmosféricas que presidem à vegetação da vinha, as quais têm uma influência marcada na composição das uvas, os sistemas de condução da vinha e o estado sanitário das uvas no momento da vindima, indo influenciar também a composição dos seus subprodutos.

O bagaço é constituído principalmente por água, cerca de 60-70%, vinho e borras, sendo estes dependentes da prensagem; álcoois, principalmente o etanol, e também o metanol, glicerol e álcoois superiores; aldeídos, ésteres, ácidos voláteis, polifenóis e taninos, proteínas, celulose, pectinas, sais minerais e resíduos de açúcar.

Os engaços são a matéria-prima menos rica e de valorização mais simples. Quando separados por máquina apropriada, constituem cerca de 3.5 – 4.5% da massa total da vindima.

Contém um teor aproximado de 50% de humidade, e que em matéria seca predomina a celulose (30 – 40%) e a lenhina e, em menor quantidade, matéria tartárica. A composição dos engaços torna imprópria a sua utilização como alimento para gado. O seu aproveitamento está limitado, como base de um “composto” ou como matéria-prima da indústria do papel e de materiais de construção, como combustível e estrume, podendo ainda ser utilizado para a obtenção de proteína vegetal, devido ao seu elevado teor celulósico. O poder calórico do engaço é da ordem das 2000 a 2500 calorias/kg, e o seu aproveitamento como combustível é muito viável.

A grainha constitui 20 a 25% do peso do bagaço húmido e cerca de 40% do bagaço fortemente prensado e desengaçado. Representa 3% em relação ao peso da uva. As grainhas, depois de individualizadas, convenientemente secas e limpas, podem ser utilizadas para extrair óleo. Apesar de a grainha apresentar um teor entre 14-20% de substâncias gordas, o seu rendimento em óleos é de apenas de 10-11%, embora com as modernas tecnologias a extração de óleos possa superar os 15%

Podem também ser utilizadas nas indústrias de rações e adubos e a extração de taninos com aplicação em indústrias enológica e farmacêutica. A partir das grainhas é possível extrair proteínas, taninos, extractos aromáticos, etanol e lenhina. Devido ao seu poder calórico é viável serem usadas como combustível, substituindo assim a nafta ou outros combustíveis de elevado custo [38].

De acordo com um estudo que tinha como objetivo determinar a composições de oito amostras de bagaço provenientes de diferentes vinificação (vinho tinto e branco) e também de diferentes áreas de produção de vinho francês (Alsace, Bordeaux, Bourgogne, Champagne, Languedoc, Val de Loire e Provence). Verificou-se grande variabilidade dependendo da casta da uva: as amostras de bagaço continham 3-6% w/w de óleo, 20-46% w/w de açúcares sobretudo xiloglucanos, e um teor de polissacarídeos pectináceos relativamente baixo. Taninos condensados representaram 20-51% w/w e podem ser extraídos num meio aquoso. um promissor fonte para a utilização deste valioso subproduto [41].

1.5. Delineamento experimental

Um dos objetivos deste trabalho é determinar a atividade antioxidante usando vários métodos, avaliar os teores totais de polifenóis, flavonóides e taninos e caracterizar quimicamente através de LC-MS (cromatografia líquida de alta eficiência –espetrometria de massa) extratos preparados a partir de folhas, peles e bagaço de uva. Os resultados serão relacionados entre os vários extratos obtidos e os vinhos produzidos a partir da casta Touriga Nacional.

Na extração destes compostos consideram-se parâmetros otimizados indicados na literatura bibliográfica, tais como o solvente de extração, a temperatura e o tempo de extração. Serão aplicadas várias metodologias de extração dos compostos, nomeadamente a infusão com água, extracção líquido- líquido (água:etanol/50:50) e soxhlet, que serão comparadas.

A quantificação dos polifenóis (como fenóis totais, flavonóides totais e taninos) será realizada por espectrofotometria de UV/Vis. Na avaliação da atividade antioxidante aplicam-se vários métodos, nomeadamente o DPPH, FRAP e ABTS.

Um outro objetivo é a validação de algumas metodologias usadas na quantificação dos polifenóis e da atividade antioxidante, nomeadamente, flavonóides totais, fenóis totais, ABTS e FRAP.

Por fim alguns dos extratos obtidos serão analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (LC) com o espectrómetro de massa (MS) para identificar os compostos presentes nos vários extratos das amostras.

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes

A água desionizada utilizada na preparação de reagentes, soluções e na diluição de amostras foi obtida com o equipamento DesminWater Portugal.

Doseamento do teor em fenóis totais

Reagente Folin-Ciocalteu (2.0 N) e carbonato de sódio anidro 99.999 % da Sigma Chemical Aldrich, ácido gálgico da Fluka e metanol (grau gradiente) da Lab-Scan (Dublin, Irlanda).

Testes de Actividade antioxidante

DPPH (free radical scavenging capacity of 2,2,diphenyl-1-picrylhydrazyl): 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) da Sigma Chemical e metanol (grau gradiente) da Lab-Scan (Dublin, Irlanda).

ABTS (2,2'azino-bis-(3-etilbenzotiazoli-6-ácido sulfônico)) - Etanol puro da Merck Millipore, Persulfato de potássio da Sigma.-Aldrich e ABTS de da AMRESCO, e o Trolox da Sigma-Aldrich.

FRAP (Ferric reducing/Antioxidant power): Trolox da Sigma Aldrich, metanol (grau gradiente) da Lab-Scan (Dublin, Irlanda), solução tampão de acetato da Sigma-Aldrich, ácido fórmico 98%, da Fluka, TPTZ ($C_{18}H_{17}N_6$) da Sigma, HCl da Fisher Chemical, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ da Sigma Aldrich.

Flavonóides Totais: Nitrito de sódio, $NaNO_2$, cloreto de alumínio, $AlCl_3$, hidróxido de sódio, NaOH e Catequinas ($C_{15}H_{14}O_6 \cdot XH_2O$) da Sigma-Aldrich.

Taninos Totais: Vanilina da Acofarma, metanol (grau gradiente) da Lab-Scan (Dublin, Irlanda), ácido clorídrico, HCl comercial 37%, Catequinas ($C_{15}H_{14}O_6 \cdot XH_2O$) da Sigma-Aldrich.

Solventes para LC-MS: Acetonitrilo (grau LC-MS) da Scharlau, ácido fórmico (grau de pureza 98%) da Fluka (ref. 94318), ácido acético (grau de pureza 95%) da Sigma Aldrich (ref. 45754) Acetonitrilo (grau LC-MS) da Scharlau.

2.2. Padrões

Doseamento do teor em fenóis totais: Preparou-se uma solução-mãe de ácido gálico 100 mgL⁻¹ em metanol e a partir desta prepararam-se soluções com diferentes concentrações (0.4-6.0 mgL⁻¹) em água desionizada.

Flavonóides Totais: Preparou-se uma solução-mãe de catequina 500 mgL⁻¹ em metanol e a partir desta prepararam-se soluções com diferentes concentrações (35-150 mgL⁻¹) em água desionizada.

Taninos Totais: Preparou-se uma solução-mãe de catequina 500 mgL⁻¹ em metanol e a partir desta solução prepararam-se soluções com diferentes concentrações (10-150 mgL⁻¹) em água desionizada.

Testes de actividade antioxidante

Método DPPH: preparou-se uma solução de DPPH na concentração de 24 mgL⁻¹ em metanol.

Método FRAP: preparou-se uma solução de Trolox na concentração de 100 mgL⁻¹ em metanol e a gama de concentrações utilizada para curva de calibração foi de 1.5 a 75 mgL⁻¹, após diluição em água desionizada.

Método ABTS: preparou-se uma solução de Trolox na concentração de 100 mgL⁻¹ em metanol e a gama de concentrações utilizada para curva de calibração foi de 0.4 a 7 mgL⁻¹, após diluição em água desionizada.

2.3. Equipamento

Preparação de extratos: Na preparação de extratos utilizou-se uma centrífugadora da Sigma 4K10 e o Rotavapor DA Heidolph: Laborate 4001 efficient.

ABTS, FRAP, Fenóis, Flavonóides e Taninos Totais: Utilizou-se o espectrofotómetro UV/Vis da ATILNICAM, Unicam UV/Vis spectrometer.

2.4. Análise por Cromatografia líquida de alta eficiência com detetores de díodos e de espetrometria de massa (LC-MS)

2.4.1. Equipamento

Utilizou-se um espectrómetro de massa tandem (MS/MS) MicroMass Quattromicro® API (Waters®, Ireland), do tipo triplo quadrupolo

O Detetor de Rede de Díodos detectou as absorvâncias nos comprimentos de onda 210 a 600 nm.

2.4.2. Condições de análise

A separação cromatográfica dos compostos na amostra foi realizada num cromatógrafo Waters Alliance 2695 (Waters®, Ireland) equipado com uma bomba quaternária, degasificador, amostrador automático e forno de coluna, acoplado a um Detetor de Rede de Díodos Waters 996 PDA (Waters®, Ireland).

Utilizou-se uma coluna de fase reversa (LiCrospher® 100 RP-18, 250x4mm; 5µm; Merck®) a 35 °C, com um volume de injeção de 10 µL. A fase móvel consiste numa mistura de Água Milli-Q acidificada com ácido fórmico a 0.5% (v/v) (solvente A) e Acetonitrilo (solvente B) com um fluxo constante de 0.30 mL/min. O programa de eluição é apresentado na tabela 1.

O Detetor de Rede de Díodos (DAD) detectou as absorvâncias nos comprimentos de onda 210 a 600 nm.

Utilizou-se um espectrómetro de massa tandem (MS/MS) MicroMass Quattromicro® API (Waters®, Ireland), do tipo triplo quadrupolo. Para aquisição e processamento de dados utilizou-se o software MassLynx® versão 4.1.

Tabela 1. Programa de eluentes usados na análise por LC-MS*

Tempo (min)	A%	B%	C%	D%	Fluxo ($\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$)	Gradiente
0.00	95.0	5.0	0.0	0.0	0.300	-
0.10	95.0	5.0	0.0	0.0	0.300	-
15.00	85.0	15.0	0.0	0.0	0.300	Linear
20.00	80.0	20.0	0.0	0.0	0.300	Linear
30.00	80.0	20.0	0.0	0.0	0.300	Linear
55.00	70.0	30.0	0.0	0.0	0.300	Linear
80.00	50.0	50.0	0.0	0.0	0.300	Linear
120.00	10.0	90.0	0.0	0.0	0.300	Linear
135.00	10.0	90.0	0.0	0.0	0.300	Linear
140.00	95.0	5.0	0.0	0.0	0.300	Linear
155.00	95.0	5.0	0.0	0.0	0.300	-

* Realizaram-se alguns ensaios com ácido acético a 0.1%

As condições de ionização foram optimizadas por infusão directa na fonte de ionização de electrospray em modo negativo (ESI). A temperatura da fonte foi mantida a 120 °C. Foi aplicado um potencial de capilar de 3.0kV e um potencial de fonte de 30V. Os espectros de massa foram obtidos em modo “Full Scan” para m/z 100-1500. Em seguida fragmentou-se do ião molecular para determinação dos fragmentos característicos (MS/MS). Foi utilizado árgon como gás de colisão na câmara de colisão.

2.5. Preparação de extratos de amostras

A preparação de extratos das amostras de folha de videira (FV), bagaço de uva (BV), uvas (U) e peles de uva (P) (Fig 6) foi realizada tendo em conta quatro métodos, inicialmente as amostras foram trituradas para que fosse possível ter uma mistura homogênea, de seguida procedeu-se a extração de acordo com os seguintes métodos:

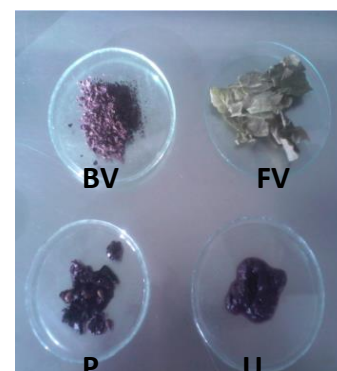


Fig 6. Amostras

2.5.1. Método A

A amostra foi adicionada a água a ferver e fez-se a sua infusão durante 30 min a 100°C (Fig.7). Centrifugou-se (20 min) a 5000 rpm e evaporou-se até à secura ($t= 40^{\circ}\text{C}$). O resíduo foi dissolvido em 8 mL de etanol a 50%.



Fig. 7. Método A (Infusão)

2.5.2. Método B

A amostra foi adicionada a etanol (50%) e fez-se a sua maceração durante 30 min, em banho-maria a 40°C (Fig. 8). Centrifugou-se (20 min) a 5000 rpm e evaporou-se até à secura ($t= 40^{\circ}\text{C}$). O resíduo foi dissolvido em 8 mL de etanol a 50%.

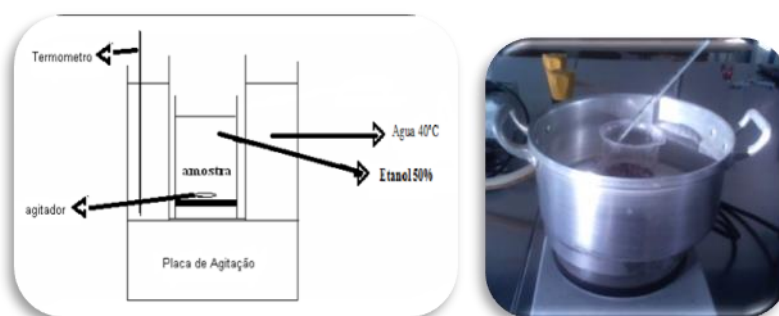


Fig 8. Método B

2.5.3. Método C

A amostra foi adicionada a etanol (50%), acidificou-se com HCl 1% e fez-se a sua maceração durante 30 min (Fig. 9). Centrifugou-se (20 min) a 5000 rpm e evaporou-se até à secura ($t= 40^{\circ}\text{C}$)

O resíduo foi dissolvido em 8 mL de etanol a 50%.



Fig. 9. Método C (Meio acidificado)

2.5.4. Método D

A amostra foi colocada num cartuxo, no balão de fundo redondo colocou-se etanol 50% e ligou-se a circulação de água, deixando-se efetuar 3 e 6 ciclos. Centrifugou-se (20 min) a 5000 rpm e evaporou-se até à secura ($t= 40^{\circ}\text{C}$). O resíduo foi dissolvido em 16 mL de etanol a 50%. (Fig. 10).



Fig. 10. Método D (Soxhlet)

Os extratos das várias amostras foram diluídos tendo em conta os testes usados, ou seja:

- Flavonóides totais: 1:25 a 1:500
- Fenóis Totais: Diluição 1:100 a 1:400
- FRAP: Diluição 1:15 a 1:1000
- ABTS: Diluição 1:500
- Taninos totais: 1:10 a 1:300

2.6. Doseamento do teor em fenóis totais

Foi usado o método do índice de Folin-Ciocalteu [3]: o desenvolvimento da reação realiza-se à temperatura ambiente, durante 30 min, com leituras espectrofotométricas a 750 nm. As amostras e as soluções padrão de ácido gálico (0.4-6 mg/L) foram preparadas e analisadas em triplicado.

2.7. Teor em Flavonóides Totais

A 250µL de extrato adicionou-se 57µL de NaNO_2 a 7% e misturou-se durante 6 minutos. Adicionou-se 150µL de AlCl_3 a 10%, e deixou-se a solução em repouso por 5 minutos. Adicionou-se 0.5mL de NaOH (1M) e ajustou-se o volume para 2.5 mL com água destilada.

As amostras e as soluções padrão de catequina (35-150 mg/L) foram preparadas, analisadas em triplicado e as absorvâncias lidas a 510 nm

2.8. Teor em taninos totais

A 50µL de extrato adicionou-se 3mL de vanilina-metanol (4%), e 1.5mL de ácido clorídrico concentrado.

As amostras e as soluções padrão de catequina (10-150 mg/L) foram preparadas, analisadas em triplicado e as absorvâncias lidas a 510 nm, ao fim de 15 minutos.

2.9. Testes de atividade antioxidante

2.9.1. Método DPPH

A 2 mL de solução metanólica de DPPH (24 mg L^{-1}), foram adicionados 50 μL de amostra e a absorvância foi lida de imediato a 517 nm. Após 16 minutos de reação fez-se novamente a leitura da absorvância. Neste teste usou-se o metanol como branco.

2.9.2. Método FRAP

Foram adicionados 100 μL de amostra diluída com água desionizada, a 3 mL de reagente FRAP que foi utilizado como branco. Os resultados são expressos em mg de equivalentes de Trolox por 1000 mL de amostra (mg TEL^{-1}). As amostras e as soluções padrão de trolox (1,5-75 mg/L) foram preparadas, analisadas em triplicado e as absorvâncias lidas a 593 nm, ao fim de 10 minutos.

2.9.3. Método ABTS

A 1.80 mL do reagente ABTS foram adicionados 200 μL de amostra diluída e a absorvância foi lida a 734 nm após 7 minutos de reação. As amostras e as soluções padrão de trolox (0.4-7 mg/L) foram preparadas, analisadas em triplicado. Neste teste usou-se o etanol como branco. Os resultados são expressos em mg de equivalentes de Trolox por 1000 mL de amostra (mg TE L^{-1}).

2.10. Validação de métodos

2.10.1. Linearidade

a) Preparou-se 6 soluções- padrão para cada método de acordo com anexo A.

- Fenóis Totais: 0.4–6 mg/L
- Flavonóides totais: 35–150 mg/L
- FRAP: 1.5–75 mg/L
- ABTS: 0.4–7 mg/L

b) Fez-se a leitura da absorvância com o comprimento de onda correspondente de cada método.

- c) Traçou-se a reta de calibração para cada método e determinou-se o coeficiente de correlação ($\geq 0,99$).

2.10.2. Determinação do LQ e LD

- a) Preparou-se 10 brancos (solvente utilizado na preparação dos padrões) para cada método.
- b) Fez-se a leitura da absorvância com o comprimento de onda correspondente de cada método.

2.10.3. Precisão

2.10.3.1. Repetibilidade

- a) Preparou-se 6 soluções-padrão para cada método de acordo com os testes aplicados:
- Fenóis Totais: 2 mg/L
 - Flavonóides totais: 75 mg/L
 - FRAP: 15 mg/L
 - ABTS: 2.5 mg/L
- b) Fez-se a leitura das absorvâncias das amostras no espectrofotómetro no comprimento de onda indicado de cada método ($CV < 1\%$).

2.10.3.2. Precisão intermédia:

- a) Preparou-se soluções-padrão com concentrações (limite inferior, médio e superior) da gama usada na determinação da linearidade.
- Fenóis Totais: 2.4, 4 e 6 mg/L
 - Flavonóides Totais: 75, 110 e 150 mg/L
 - FRAP: 7, 25 e 75 mg/L
 - ABTS: 0.4, 2.5 e 6 mg/L
- b) Fez-se a leitura das absorvâncias das amostras no espectrofotómetro no comprimento de onda indicado de cada método.
- c) Efetuou-se durante 3 dias consecutivo.

2.10.3.3. Exatidão

a) Preparou-se soluções-padrão com concentrações (limite inferior, médio e superior) da gama usada na determinação da linearidade.

- Fenóis Totais: 2.4, 4 e 6 mg/L
- Flavonóides Totais: 75, 110 e 150 mg/L
- FRAP: 7, 25 e 75 mg/L
- ABTS: 0.4, 2.5 e 6 mg/L

b) Adicionou-se quantidades conhecidas de padrão à amostra e avaliou-se a exatidão nas concentrações do início, meio e fim da reta de calibração.

3. Resultados e Discussão

3.1. Validação de métodos analíticos

A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. No âmbito desta tese foram validados os seguintes métodos: i) Folin-Ciocalteu; ii) Flavonóides; iii) FRAP e iv) ABTS. Apenas se selecionou os métodos com relativa importância na quantificação de compostos fenólicos, assim como na avaliação da atividade antioxidante.

A validação dos métodos foi abordada tendo em conta os seguintes parâmetros: i) linearidade; ii) limite de detecção e de quantificação; iii) precisão e iv) exactidão.

3.1.1. Doseamento do teor em fenóis totais

No estudo da linearidade foi aplicado o método dos mínimos quadrados (regressão linear), tendo sido considerados como parâmetros o coeficiente de correlação (r), valor de declive, valor de intercepção no eixo dos Y e a distribuição dos resíduos. Os critérios de aceitação considerados são i) coeficiente de correlação ser maior do que 0.99 e ii) os resíduos distribuídos aleatoriamente em torno de zero.

A Fig. 11 representa a regressão linear da absorvância em função das concentrações entre 0.4 mg/L e 6.0 mg/L em ácido gálgico para o método Folin-Ciocalteu.

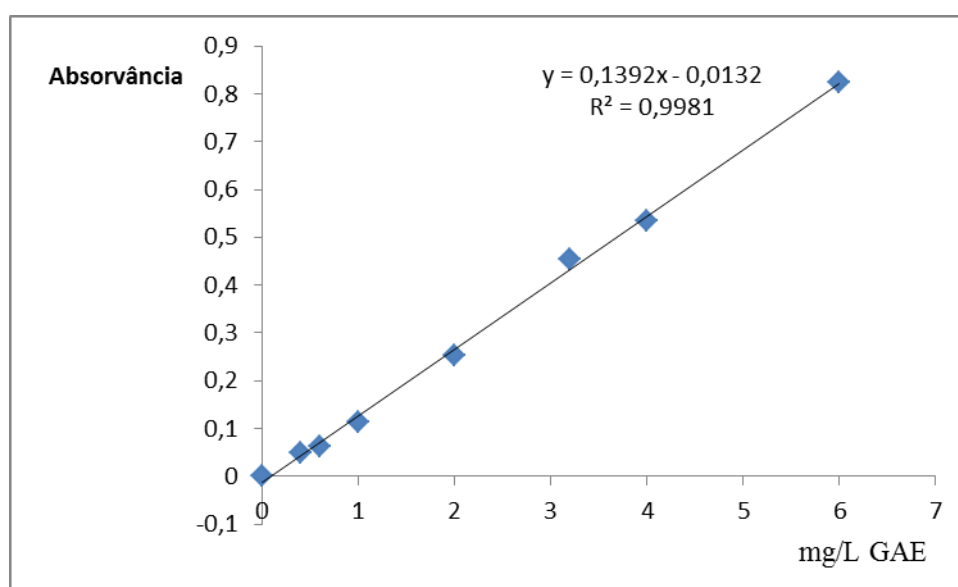


Fig. 11. Absorvância em função das concentrações entre 0.4 mg/L e 6.0 mg/L em ácido gálgico

Os parâmetros obtidos através da regressão linear permitem concluir que o método é linear dentro do intervalo de concentrações estudadas, cumprindo os critérios de aceitação como se pode observar na Fig. 12 e na tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros da regressão linear

Parâmetro	Resultados
r	0.9981
Declive	0,1392
Interceção	-0.0132

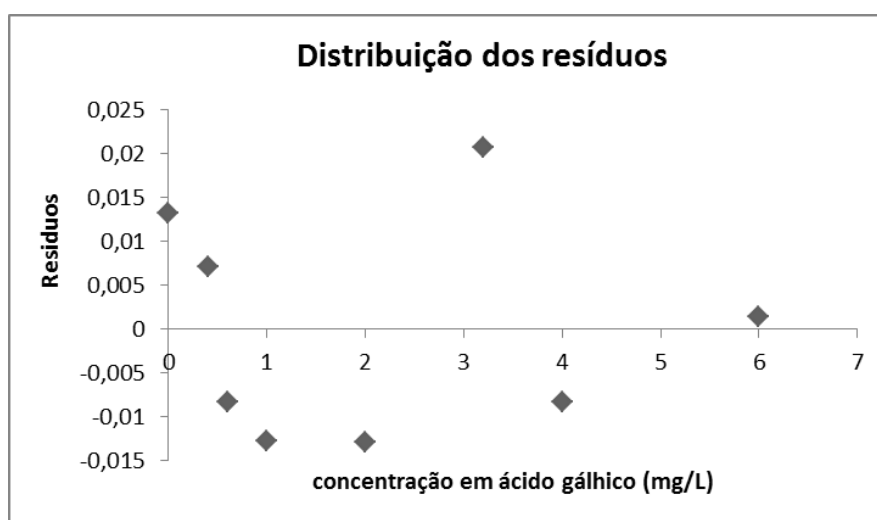


Fig. 12. Distribuição residual em torno de zero para a linearidade do método Folin-Ciocalteu

A tabela 3 apresenta as concentrações confirmadas experimentalmente que permitem identificar com fiabilidade o limite de deteção e de quantificação e apresentaram valores de desvio padrão relativo aceitáveis para as 10 repetições do branco ($CV \leq 2,0\%$).

Tabela 3. Limites de deteção e de quantificação obtidos no método Folin-Ciocalteu

Limite	Concentração (mg/L)
Deteção (LD)	0.531
Quantificação (LQ)	1.771

Verifica-se que no método de fenóis totais é possível detetar a partir de uma concentração de 0.531 mg/L, e quantificar a partir de 1.771 mg/L.

De modo a demonstrar a repetibilidade dos resultados foram preparados 6 padrões de concentração igual (2 mg/L) no meio da reta a partir da mesma amostra homogénea e analisada a variação obtida que foi de 0.61%. Na situação da precisão intermédia prepararam-se 6 padrões de concentração 2, 4 e 6 mg/L obtendo-se os valores de 1.09%, 1.09% e 0.75% respetivamente.

Para a repetibilidade ($CV < 1\%$) e precisão intermédia ($CV < 2\%$) o coeficiente de variação está dentro do esperado, o que indica que as amostras são homogéneas, pois quanto menor o CV mais homogéneas são as amostras.

No estudo da exatidão foram analisadas soluções padrão em ácido gálico de concentrações 2.0, 4.0 e 6.0 mg/L e amostras em que se adicionam quantidades conhecidas à amostra de bagaço de forma a obter concentrações de 1.93, 3.98 e 5.98 mg/L. A tabela 4 mostra que o valor da exatidão está compreendido entre 98.8% e 103.3% para as amostras e padrões. Pela análise dos resultados da amostra verificou-se que o método de doseamento não apresenta problemas, uma vez que a percentagem de recuperação obtida encontrou-se entre 98 % - 102 % (critério de aceitação).

Tabela 4. Exatidão no método Folin-Ciocalteu

Padrões		Amostra de Bagaço	
Concentração (mg/L)	Exatidão (%)	Concentração (mg/L)	Exatidão (%)
2.0	99.4	1.93	98.8
4.0	99.7	3.98	100.7
6.0	103.3	5.98	101.4

3.1.2. Doseamento do teor em flavonóides totais

No estudo da linearidade aplicou-se o método dos mínimos quadrados (regressão linear), tendo sido considerados como parâmetros o coeficiente de correlação (r), valor de declive, valor de interceção no eixo dos Y e a distribuição dos resíduos. Tal como referido anteriormente os critérios de aceitação considerados são i) coeficiente de correlação é maior do que 0.99 e ii) os resíduos distribuídos aleatoriamente em torno de zero.

A Fig. 13 representa a regressão linear da absorvância em função das concentrações entre 35 mg/L e 150 mg/L em catequina.

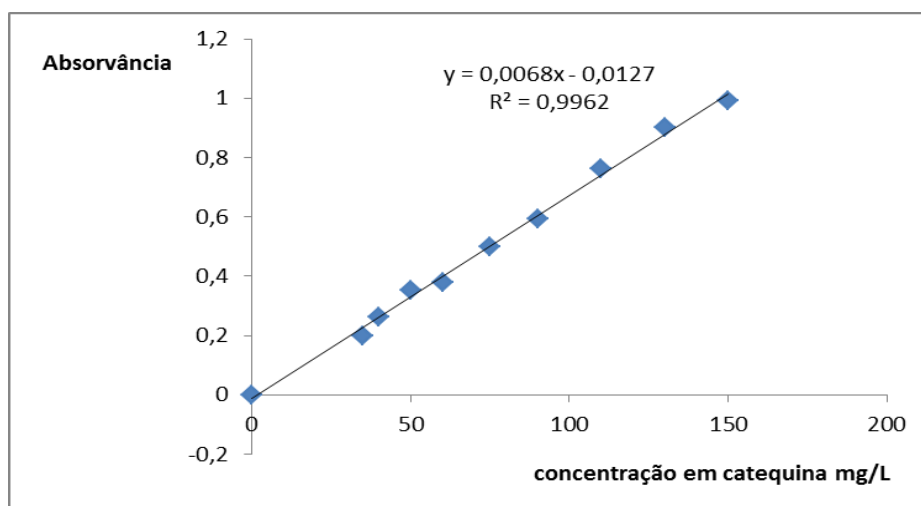


Fig. 13. Absorvância em função das concentrações entre 35 mg/L e 150 mg/L em catequina

Os parâmetros obtidos através da regressão linear permitem concluir que o método é linear dentro do intervalo de concentrações estudadas, cumprindo os critérios de aceitação como se pode observar na Fig. 14 e na tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros da regressão linear no doseamento do teor em flavonóides

Parâmetro	Resultados
r	0.9962
Declive	0.0068
Interceção	-0.0127

A tabela 6 apresenta as concentrações confirmadas experimentalmente que permitem identificar com fiabilidade o limite de deteção e de quantificação e apresentaram valores de desvio padrão relativo aceitáveis para as 10 repetições do branco ($CV \leq 2,0\%$).

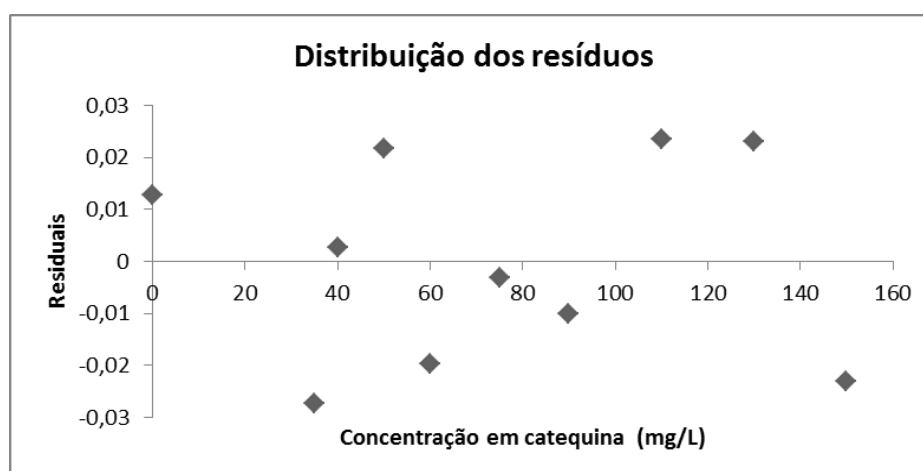


Fig. 14. Distribuição residual em torno de zero para a linearidade doseamento do teor em flavonóides

Tabela 6. Limites de detecção e de quantificação obtidos no doseamento do teor em flavonóides

Limite	Concentração (mg/L)
Deteção (LD)	20.52
Quantificação (LQ)	68.39

Verifica-se que no doseamento do teor em flavonóides é possível detetar a partir de uma concentração de 20.52 mg/L, e quantificar a partir de 68.39 mg/L.

De modo a demonstrar a repetibilidade dos resultados foram preparados 6 padrões de concentração igual (75 mg/L) no meio da reta a partir da mesma amostra homogénea e analisada a variação obtida que foi de 0.33%. Na situação da precisão intermédia prepararam-se 6 padrões de concentração 75, 110 e 150 mg/L obtendo-se os valores de 0.17%, 0.02% e 0.58% respetivamente.

Para a repetibilidade ($CV < 1\%$) e precisão intermédia ($CV < 2\%$) o coeficiente de variação está dentro do esperado, o que indica que as amostras são homogéneas, pois quanto menor o CV mais homogéneas são as amostras.

No estudo da exatidão foram analisados soluções padrão em catequina de concentrações 75, 110 e 150 mg/L e amostras em que se adicionar quantidades conhecidas de catequina à amostra de bagaço de forma a obter concentrações de 0.17, 0.02 e 0.58 mg/L.

A tabela 7 mostra que o valor da exatidão está compreendido entre 99.9% e 103.8%.para as amostras e padrões. Pela análise dos resultados da amostra verificou-se que o método de doseamento não apresenta problemas, uma vez que a percentagem de-recuperação obtida encontrou-se entre 98 % - 102 % (critério de aceitação).

Tabela 7. Exatidão no método do teor em flavonóides totais

Padrões		Amostra de Bagaço	
Concentração (mg/L)	Exatidão (%)	Concentração (mg/L)	Exatidão (%)
75	99.9	75.5	99.9
110	103.3	112.5	100.0
130	103.8	133.3	100.7

3.1.3. Método de FRAP

A linearidade foi estudada aplicando-se o método dos mínimos quadrados (regressão linear), em que se avaliou o coeficiente de correlação (r), valor de declive, valor de interceção no eixo dos Y e a distribuição dos resíduos. Tal como referido anteriormente os critérios de

aceitação considerados são i) coeficiente de correlação é maior do que 0.99 e ii) os resíduos distribuídos aleatoriamente em torno de zero.

A Fig.15 representa a regressão linear da absorvância em função das concentrações entre 2.5 mg/L e 75 mg/L em trolox.

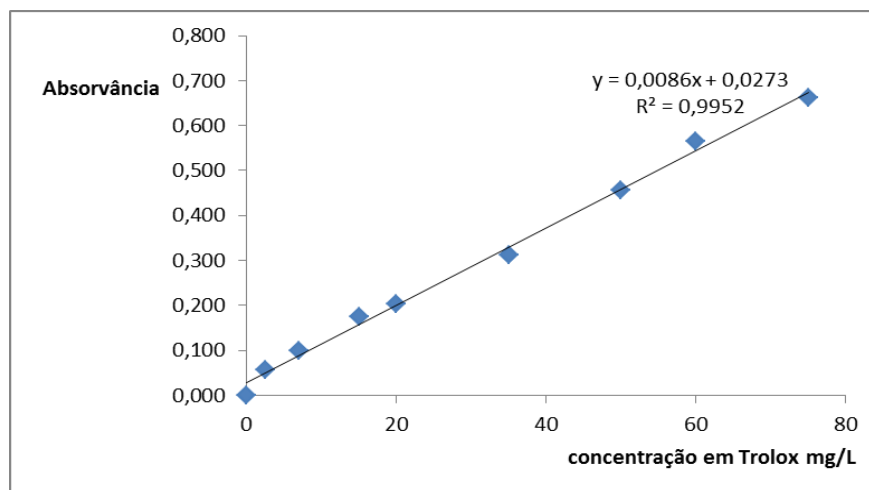


Fig. 15. Linearidade no método de FRAP

Os parâmetros obtidos através da regressão linear permitem concluir que o método é linear dentro do intervalo de concentrações estudadas, cumprindo os critérios de aceitação como se pode observar na tabela 8 e na Fig. 16.

Tabela 8. Parâmetros da regressão linear no método de FRAP

Parâmetro	Resultados
r	0.9952
Declive	0.0086
Interceção	0.0273

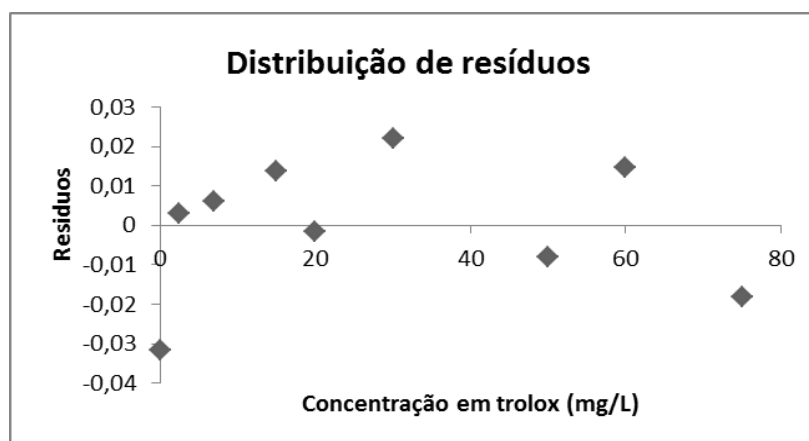


Fig. 16. Distribuição residual em torno de zero para a linearidade do método de FRAP

A tabela 9 apresenta as concentrações confirmadas experimentalmente que permitem identificar o limite de detecção e de quantificação e apresentaram valores de desvio padrão relativo aceitáveis para as 10 repetições do branco ($CV \leq 2,0\%$).

Tabela 9. Limites de detecção e de quantificação obtidos no método de FRAP

Limite	Concentração (mg/L)
Deteção (LD)	1.95
Quantificação (LQ)	6.53

Verifica-se que no método de FRAP é possível detetar a partir de uma concentração de 1.95mg/L, e quantificar a partir de 6.53 mg/L.

De modo a demonstrar a repetibilidade dos resultados foram preparados 6 padrões de concentração igual (15 mg/L) no meio da reta a partir da mesma amostra homogénea e analisada a variação obtida que foi de 0.99%. Na situação da precisão intermédia prepararam-se 6 padrões de concentração 7, 25 e 75 mg/L obtendo-se os valores de 1.00%, 1.04% e 1.25% respetivamente.

Para a repetibilidade ($CV < 1\%$) e precisão intermédia ($CV < 2\%$) o coeficiente de variação está dentro do esperado, o que indica que as amostras são homogéneas, pois quanto menor o CV mais homogéneas são as amostras.

No estudo da exatidão foram analisados soluções padrão em trolox de concentrações 7, 35 e 75 mg/L e amostras em que se adicionar quantidades conhecidas de trolox à amostra de bagaço de forma a obter concentrações de 75.5, 112.5 e 133.3 mg/L.

A tabela 10 mostra que o valor da exatidão está compreendido entre 99.9% e 101,6%.para as amostras e padrões. Pela análise dos resultados da amostra e dos padrões verificou-se que o método de doseamento não apresenta problemas, uma vez que a percentagem de-recuperação obtida encontrou-se entre 98 % - 102 % (critério de aceitação).

Tabela 10. Exatidão dos padrões e amostras no método de FRAP

Padrões		Amostra de Bagaço	
Concentração (mg/L)	Exatidão (%)	Concentração (mg/L)	Exatidão (%)
7	99.9	7,6	99.6
35	100.1	36,4	100.7
75	100.4	74,9	101.6

3.1.4. Método de ABTS

A linearidade foi estudada aplicando-se o método dos mínimos quadrados (regressão linear), em que se avaliou o coeficiente de correlação (r), valor de declive, valor de interceção no eixo dos Y e a distribuição dos resíduos. Tal como referido anteriormente os critérios de aceitação considerados são i) coeficiente de correlação é maior do que 0.99 e ii) os resíduos distribuídos aleatoriamente em torno de zero.

A Fig. 17 representa a regressão linear da absorvância em função das concentrações entre 0.4 mg/L e 7 mg/L em trolox.

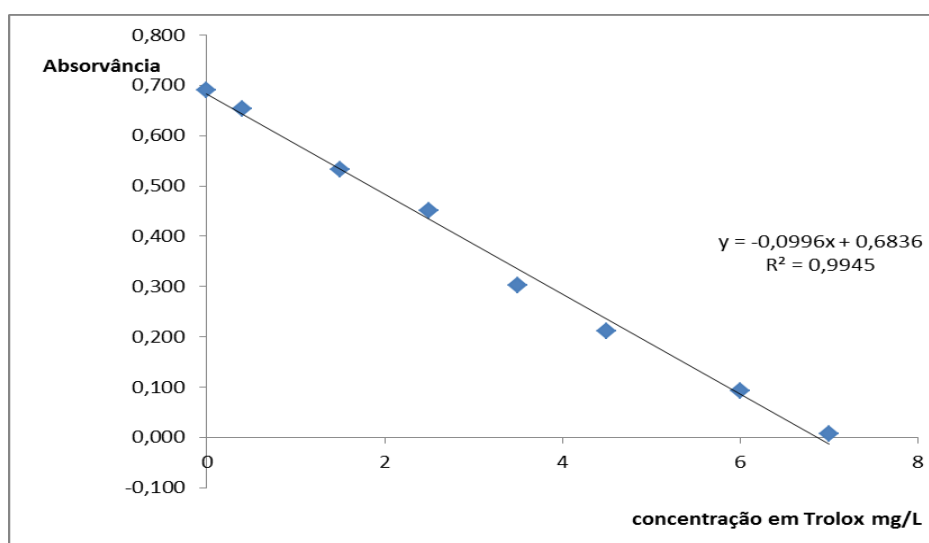


Fig. 17. Linearidade no método de ABTS

Os parâmetros obtidos através da regressão linear permitem concluir que o método é linear dentro do intervalo de concentrações estudadas, cumprindo os critérios de aceitação como se pode observar na tabela 11 e na Fig.18.

Tabela 11. Parâmetros da regressão linear no método ABTS

Parâmetro	Resultados
r	0.9945
Declive	-0.0996
Interceção	0.6836

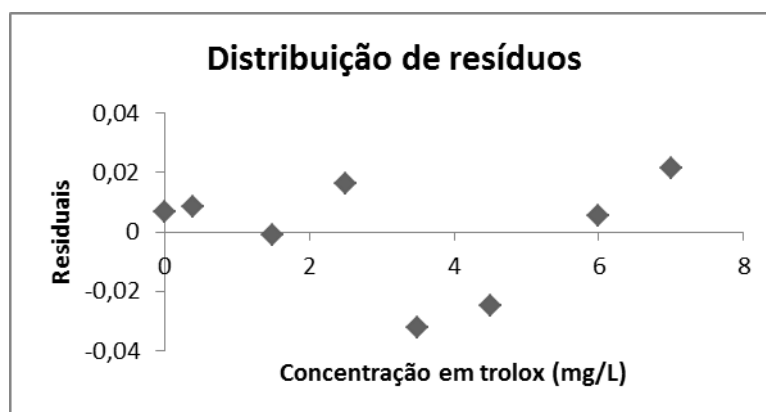


Fig. 18. Distribuição residual em torno de zero para a linearidade do método de ABTS

A tabela 12 apresenta as concentrações confirmadas experimentalmente que permitem identificar o limite de detecção e de quantificação e apresentaram valores de desvio padrão relativo aceitáveis para as 10 repetições do branco ($CV < 2,0\%$).

Tabela 12. Limites de detecção e de quantificação obtidos no método de ABTS

Limite	Concentração (mg/L)
Deteção (LD)	0.096
Quantificação (LQ)	0.319

Verifica-se que no método de ABTS é possível detetar a partir de uma concentração de 0.096 mg/L, e quantificar a partir de 0.319 mg/L.

De modo a demonstrar a repetibilidade dos resultados foram preparados 6 padrões de concentração igual (2.5 mg/L) no meio da reta a partir da mesma amostra homogénea e analisada a variação obtida que foi de 0.63%. Na situação da precisão intermédia prepararam-se 6 padrões de concentração 0.4, 2.5 e 6.0 mg/L obtendo-se os valores de 1.24%, 0.93% e 0.277% respetivamente.

Para a repetibilidade ($CV < 1\%$) e precisão intermédia ($CV < 2\%$) o coeficiente de variação está dentro do esperado, o que indica que as amostras são homogéneas, pois quanto menor o CV mais homogéneas são as amostras.

No estudo da exatidão foram analisados soluções padrão em trolox de concentrações 0.4, 2.5 e 6.0 mg/L e amostras em que se adicionar quantidades conhecidas de trolox à amostra de bagaço de forma a obter concentrações de 0.38, 2.25 e 6.14 mg/L.

A tabela 13 mostra que o valor da exatidão está compreendido entre 98.3% e 102.3%.para as amostras e padrões. Pela análise dos resultados da amostra verificou-se que o método de doseamento não apresenta problemas, uma vez que a percentagem de-recuperação obtida encontrou-se entre 98 % - 102 % (critério de aceitação).

Tabela 13. Exatidão dos padrões e amostras doseamento do teor em flavonóides

Padrões		Amostra de Bagaço	
Concentração (mg/L)	Exatidão (%)	Concentração (mg/L)	Exatidão (%)
0.4	98.3	0.38	98.3
2.5	100.6	2.25	99.3
6.0	102.3	6.14	101.3

3.2. Análise e comparação de extratos naturais de subprodutos da vinha e do vinho

Para a realização dos vários ensaios prepararam-se diferentes extratos das várias amostras utilizando cinco métodos (A, B, C D3c e D6c) e determinou-se o teor em fenóis totais, flavonóides totais e taninos de cada um dos extratos e amostras de vinho A e B.

O estudo comparativo do teor em fenóis totais (tabela 14) mostrou que de uma forma geral o melhor método de extração de fenóis totais foi o do Soxlet de 6 ciclos, sendo que a amostra com maior concentração de fenóis totais é o bagaço. Relativamente ao extrato de peles de uvas tintas observa-se um maior teor em fenóis totais quando se aplica o método B.

Tabela 14. Teor em Fenóis totais (mg GAE.L⁻¹), para os diferentes extratos

	FV	U	BV	P
A	18352±49	3490±49	15040±491	6047±81
B	22725±67	4605±56	13100±64	22960±67
C	17258±49	5537±32	6626±37	6958±85
D 3c	22343±44	11816±29	32847±88	14402±29
D 6c	32215±33	14967±17	34954±152	17113±33

Realça-se, no entanto que o método de Folin-Ciocalteu não é um método específico, pois determina todos os fenólicos presentes, além de substâncias redutoras adicionadas ou naturalmente presentes e que podem assim interferir com os resultados obtidos.

Quanto ao teor em flavonóides (tabela 15) verifica-se, de forma semelhante ao teor em fenóis totais, que de uma forma geral o melhor método de extração foi o do Soxlet de 6 ciclos, e a amostra com maior concentração em flavonóides é o bagaço. Relativamente ao extrato de folhas de videira observa-se um maior teor em flavonóides quando se aplica o método B.

Tabela 15. Teor em Flavonóides (mg/L), para os diferentes extratos

	FV	U	BV	P
A	211758±262	22523±227	27750±197	40970±174
B	307061±1144	22788±537	102212±1144	90879±347
C	181091±909	48379±525	46485±347	41121±237
D 3c	241037±257	140444±444	431111±2222	235111±889
D 6c	288889±889	181630±679	449630±4626	195704±513

O ião Al^{3+} forma complexos estáveis com os flavonóides em metanol, ocorrendo um desvio para maiores comprimentos de onda (batocrômico) e uma intensificação da absorção. Os ácidos fenólicos, mesmo os que formam complexos com $AlCl_3$, absorvem em comprimentos de onda muito inferiores, evitando-se dessa maneira, interferências nas medidas de absorvância.

A tabela 16 apresenta os resultados obtido na determinação dos taninos, verificando-se que o melhor método de extração foi o do soxlet de 6 ciclos, sendo que a amostra com maior concentração em taninos é a pele de uvas tintas.

Tabela 16. Teores em taninos (mg/L), para os diferentes extratos

	U	BV	P
A	83125±4330	79375±4330	88125±20879
B	100625±2165	110625±3750	105625±10825
C	83125±2165	83125±4330	89375±9437
D 3c	80625±3750	73125±3750	73125±3750
D 6c	88125±7500	90625±7806	125625±3750

O método de determinação dos taninos é específico para uma classe limitada de compostos que apresentam uma ligação simples na posição 2,3 e grupos hidroxila em posições alternadas no anel A. Leucoantocianidinas (catequinas) e proantocianidinas (taninos) reagem com a vanilina na presença de HCl para produzir um produto de condensação vermelho.

Na caracterização antioxidante dos vários extratos aplicaram-se os métodos de DPPH, FRAP e ABTS, porque se pretendia avaliar a atividade antioxidante dos compostos presentes nas amostras. Normalmente é um tipo de procedimento a efetuar já que não há apenas um único método que permita ter a informação completa sobre os diferentes mecanismos da atividade antioxidante nestas amostras. O contributo de cada composto fenólico depende do método de análise usado originando atividade antioxidante diferente.

De acordo com os resultados obtidos (tabela 17) pode-se concluir que, o melhor método de extração foi o método A sendo que a amostra com maior atividade antioxidante usando o método de DPPH é o extrato de uva (86.67 %).

Tabela 17. Valores de DPPH (%), para os diferentes extratos

	FV	U	BV	P
A	79.84±0.11	86.67±0.52	55.59±0.37	51.41±0.23
B	62.87±0.88	40.99±0.12	44.33±0.77	72.70±3.10
C	78.04±0.11	56.88±0.18	52.22±0.59	68.85±0.20
D 3c	40.34±0.43	62.22±0.40	43.91±0.12	43.96±0.12
D 6c	50.51±0.20	64.35±0.36	47.46±0.31	51.97±0.31

No entanto a avaliação da atividade antioxidante dos vários extratos usando o método de FRAP, conduz a conclusões diferentes, como se pode verificar na tabela 18.

Tabela 18. Teor em trolox (mgTE.L⁻¹), para os diferentes extratos usando o método de FRAP

	FV	U	BV	P
A	2990±26	666±7	100±1	418±2
B	3741±22	785±2	1569±10	1920±17
C	2750±50	438±5	162±1	1182±8
D 3c	18614±121	22833±88	22911±121	23686±116
D 6c	23958±139	34038±67	26884±58	34039±116

Observa-se que o melhor método de extração foi o do Soxlet de 6 ciclos, sendo que as amostras com maior atividade antioxidante são a pele de uvas tintas ($34039 \text{ mg TE.L}^{-1}$) e as uvas ($34038 \text{ mg TE.L}^{-1}$).

Na avaliação da atividade antioxidante dos vários extratos usando o método de ABTS (tabela 19), conclui-se que a aplicação do método B origina maior atividade antioxidante para os extratos U ($3328 \text{ mg TE.L}^{-1}$) e BV ($3330 \text{ mg TE.L}^{-1}$). O melhor método de extração para a amostra FV ($3385 \text{ mg TE.L}^{-1}$) é o de Soxlet de 6 ciclos, no entanto para a amostra P ($3326 \text{ mg TE.L}^{-1}$) é o método C.

Tabela 19. Teor em trolox (mgTE.L^{-1}), para os diferentes extratos usando o método de ABTS

	FV	U	BV	P
A	3320±10	1656±10	1112±10	1989±10
B	3325±3	3328±10	3330±8	3114±8
C	3335±8	2960±13	2394±10	3326±9
D 3c	3368±8	3202±10	3261±5	3244±10
D 6c	3385±8	3266±9	3293±10	3273±10

Na Fig. 19 apresentam-se os valores obtidos para os vinhos A e B relativamente ao teor em fenóis totais, flavonóides totais e taninos.

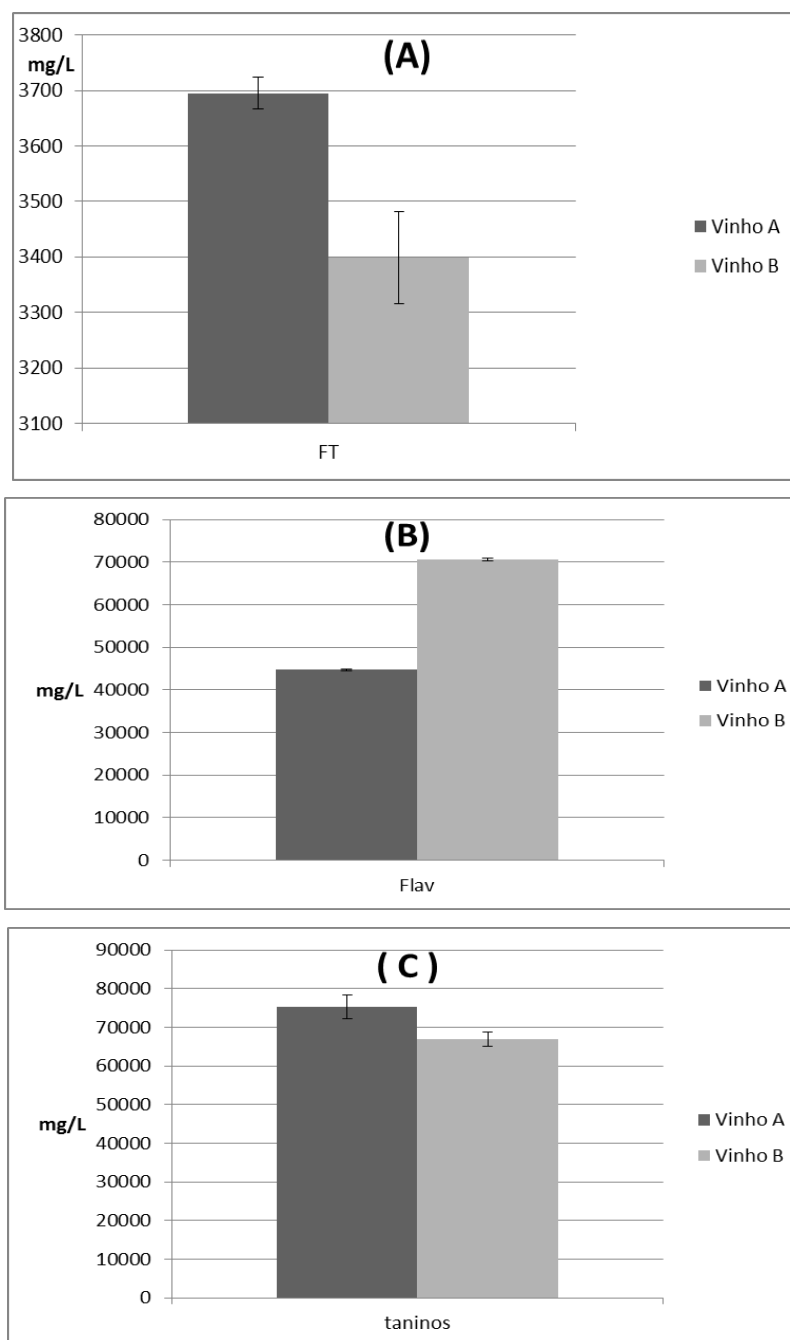


Fig. 19. Teor em fenóis totais (A), flavonóides totais (B) e taninos (C) das amostras de vinho A e B

Observa-se que o vinho A apresenta um teor superior em fenóis totais e taninos do que o vinho B. Estes vinhos foram produzidos no mesmo ano a partir da casta Touriga Nacional e recolhidos de cubas inox diferentes. Relativamente à atividade antioxidante podemos verificar (Fig. 20) que o vinho A apresenta maior actividade antioxidante pelo método FRAP e ABTS.

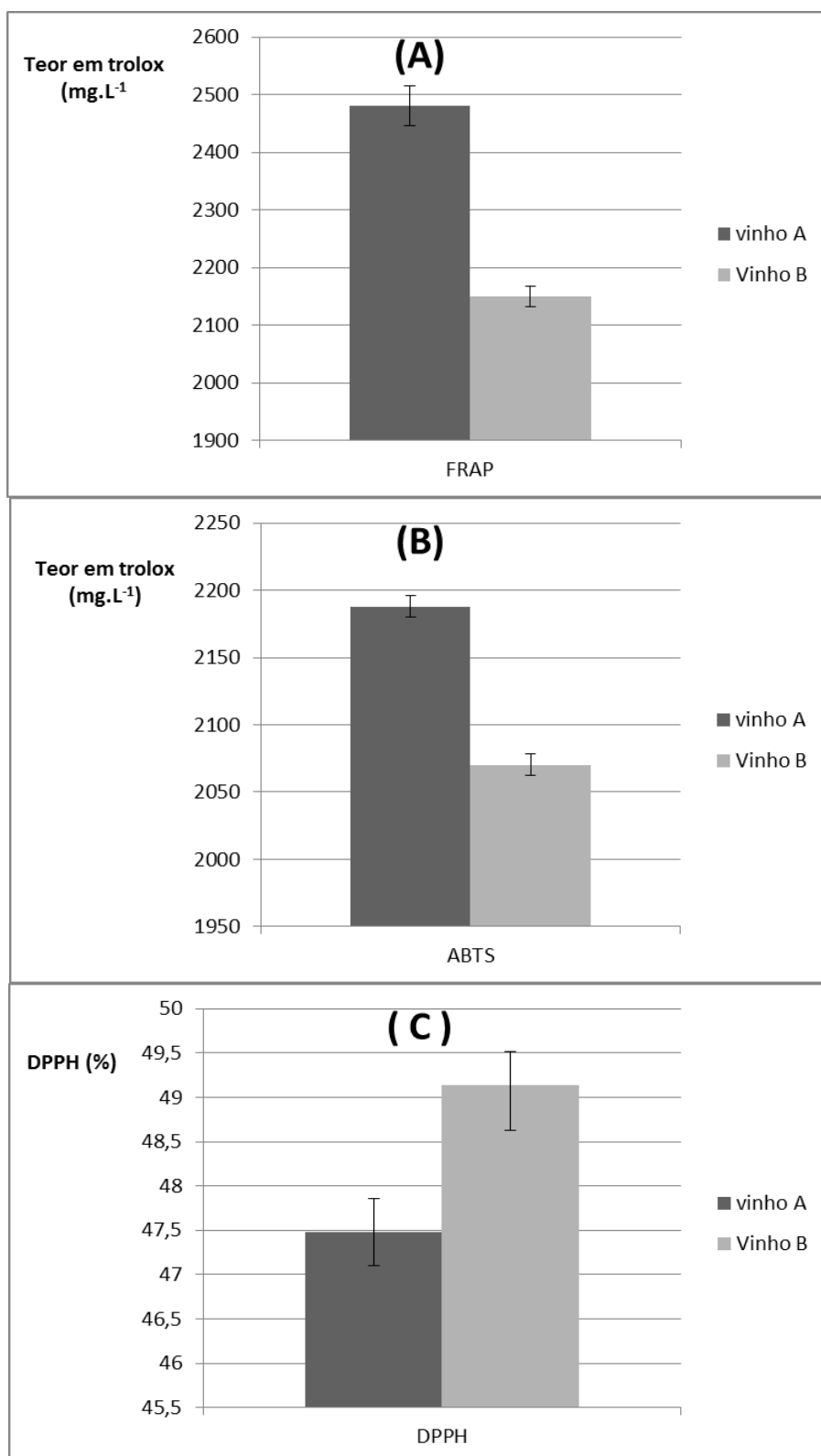


Fig. 20. Atividade antioxidante FRAP (A), ABTS (B) e DPPH (C) das amostras de vinho A e B

O vinho B apresenta um teor em flavonóides maior e maior actividade antioxidante pelo método DPPH.

A associação entre duas variáveis quantitativas é preferencialmente expressa por um coeficiente de correlação. Existem diversos coeficientes de correlação, sendo os principais o coeficiente de correlação de Pearson (adequado à avaliação de relações lineares). O facto de o valor de um coeficiente de correlação se situar entre -1 e +1 torna a sua interpretação muito facilitada. Através de uma única medida permite avaliar o sentido e intensidade da relação entre duas variáveis quantitativas.

Correlacionou-se os resultados dos testes da atividade antioxidante DPPH, FRAP e ABTS com o teor em fenóis totais (mg.L^{-1} GAE), em flavonóides e taninos de forma a verificar se os compostos extraídos contribuem para a atividade antioxidante destas amostras para o método de extração D6c.

A Fig. 21 apresenta a correlação entre o teor em fenóis totais (TP) e flavonóides totais (Flav) para as amostras P, BV e U. O valor de R (1) que se obtém quando se relacionam estas duas variáveis vem confirmar a existência de uma relação linear entre elas. Quando se introduz a amostra FV obtém-se um valor de R inferior (0.8994). A dispersão dos resultados que originou um valor de correlação menor, pode ser explicada pelo facto da amostra FV ser diferente das outras amostras. Apesar de apresentar um elevado teor em fenóis totais ($32215 \pm 33 \text{ mg/L}$), o teor em flavonóides totais ($288889 \pm 889 \text{ mg/L}$) foi elevado mas a correlação entre estas duas variáveis não é linear. Pode ser explicado pela existência de compostos na amostra FV que interferem com os métodos de quantificação do teor em flavonóides e fenóis totais.

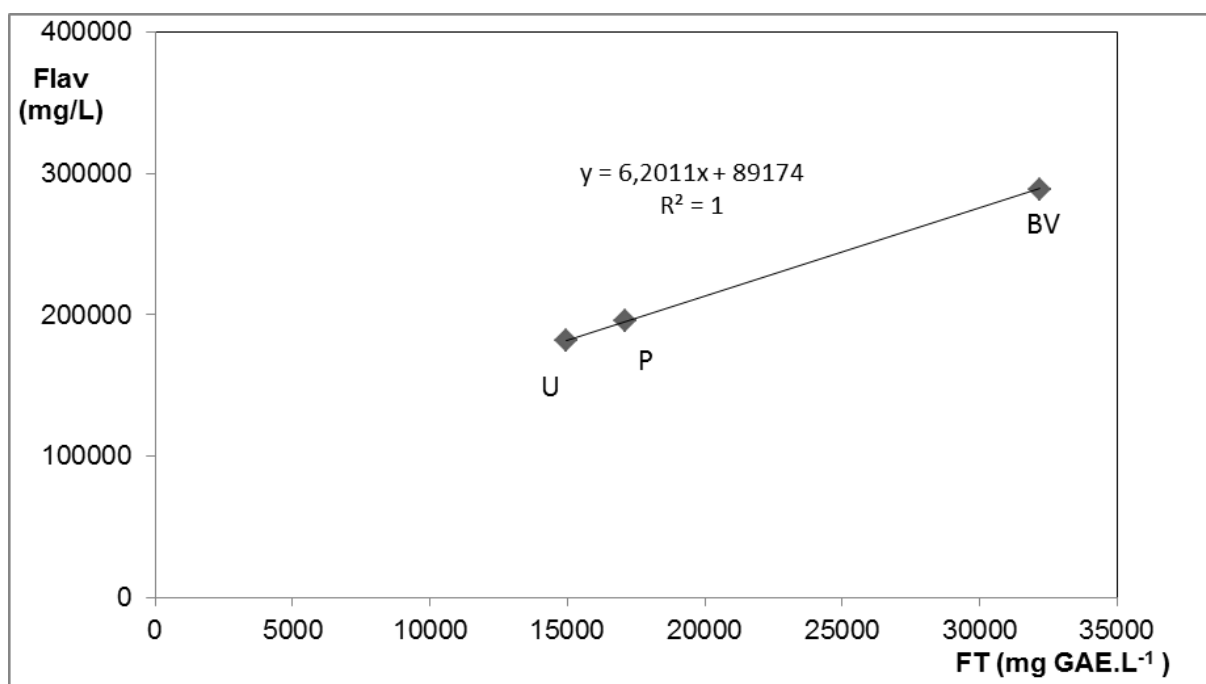


Fig.21.Relação entre o teor em flavonóides totais e o teor em fenóis totais das amostras U, P e BV

Na tabela 20 apresentam-se os coeficientes de correlação (R) quando se comparam para as amostras em estudo e para cada método os resultados correspondentes às variáveis fenóis totais (TP), flavonóides totais (Flav), DPPH, FRAP e ABTS. Observam-se valores de correlação superiores para o método C entre TP e DPPH e FRAP. Observa-se um valor de coeficiente de correlação elevado (0.9603) entre as variáveis TP e ABTS para o método B. No entanto verifica-se que a relação linear entre TP e FRAP é baixa, pois apresenta valores de R pequenos.

Tabela 20. Correlação (R) entre várias variáveis para as amostras em estudo

FT (mg GAE L ⁻¹)	Método	DPPH	FRAP	ABTS
	A	0.7875	0.5500	0.7884
	B	0.9574	0,4641	0.9603
	C	0.9590	0.6839	0.6726
	D3c	0.7639	0.4383	0.9512
	D6c	0.8848	0.6497	0.4268
Flav (mg cat L ⁻¹)	A	0.6122	0.8199	0.9690
	B	0.6420	0.7694	0.4958
	C	0.8811	0.4825	0.6886
	D 3c	0.3989	0.6487	0.6886
	D 6c	0.4651	0.8582	0.7668

Mas se compararmos as variáveis Flav e FRAP os coeficientes de correlação aumentaram de uma forma geral, sendo o método D6c o que apresenta maior coeficiente de correlação (0.8582). Verifica-se um valor de coeficiente de correlação elevado (0.9690) entre as variáveis FT e ABTS para o método B, enquanto que o método de extração C apresenta maior correlação (0.8811) entre estas variáveis.

É importante referir que nem todos os compostos têm a mesma atividade antioxidante, pois está principalmente relacionada com a estrutura dos compostos presentes nas amostras e não com a concentração em que estes compostos existem nas amostras. Além disso o factor matriz do alimento também é importante, porque na matriz os compostos podem ter efeitos de sinergias ou por outro lado inibição da actividade.

Conforme se verificou o valor de R que se obtém quando se relaciona o teor dos fenóis totais com o teor em flavonóides é diferente consoante o método aplicado, obtendo-se uma

boa correlação nos métodos C e D3c, como se observa na Fig. 22 do que nos métodos A ($R=0.4934$), B (0.6944) e D6c (0.8994).

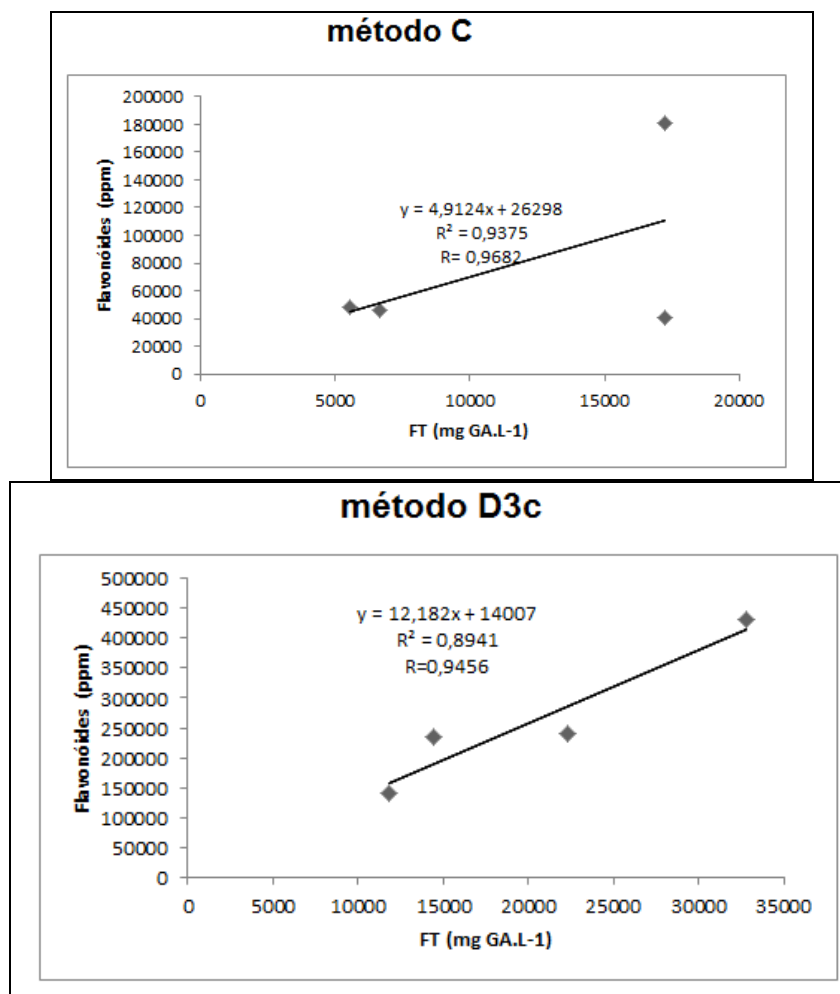


Fig. 22. Correlação entre o teor em fenóis totais e o teor em flavonóides para os métodos C e D3c

Correlacionou-se os resultados do método FRAP (mg TE.L^{-1}) com os métodos DPPH (%) de forma a verificar se os compostos fenólicos extraídos usando-se um dado método contribuem da mesma forma para a atividade antioxidante mesmo que o método de avaliação seja diferente.

O método A apresentou uma maior correlação ($R=0.9197$), como se pode observar na Fig. 23.

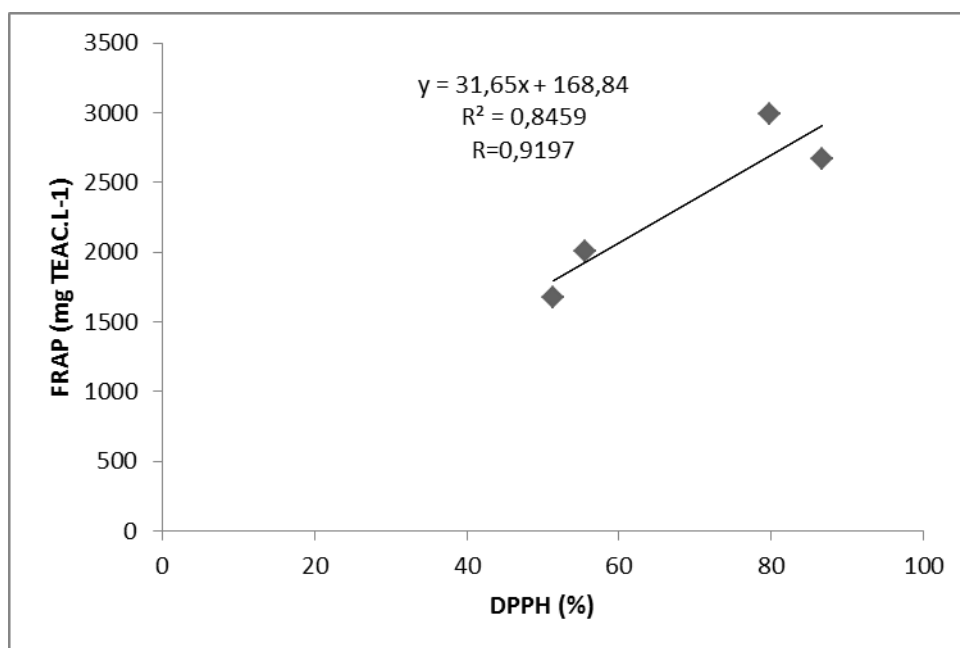


Fig. 23. Correlação entre método FRAP e DPPH para o método A

Além da correlação acima mencionada estabeleceram-se outras entre os vários métodos relacionados com a atividade antioxidante (FRAP, DPPH e ABTS) como se pode observar nas tabelas 21 e 22.

Tabela 21. Correlação (R) entre FRAP, ABTS e DPPH para os vários métodos e amostras em estudo

	Método	ABTS	DPPH
FRAP	A	0.9539	0.5507
	B	0.0300	0.5975
	C	0.6801	0.9658
	D3c	0.9045	0.4001
	D6c	0.8683	0.6544

Tabela 22. Correlação (R) entre ABTS e DPPH para os vários métodos e amostras em estudo

	Método	DPPH
ABTS	A	0.4135
	B	0.7813
	C	0.6817
	D3c	0.7527
	D6c	0.4409

O método A apresentou uma maior correlação ($R=0.9539$) entre os métodos FRAP e ABTS, enquanto que entre FRAP e DPPH tem-se o método C ($R=0.9658$) e entre ABTS e DPPH considera-se o método B.

3.3. Identificação de compostos nos extratos dos subprodutos por LC-MS

Com o objetivo de verificar que compostos estão presentes nas amostras procedeu-se à análise de alguns extratos por LC-MS com a fonte de ionização eletrospray (ESI) em modo negativo. Na Fig.24 comparam-se os cromatogramas de corrente iónica total (TIC) para o extrato de bagaço tendo em conta os métodos de extração B, C e D6c.

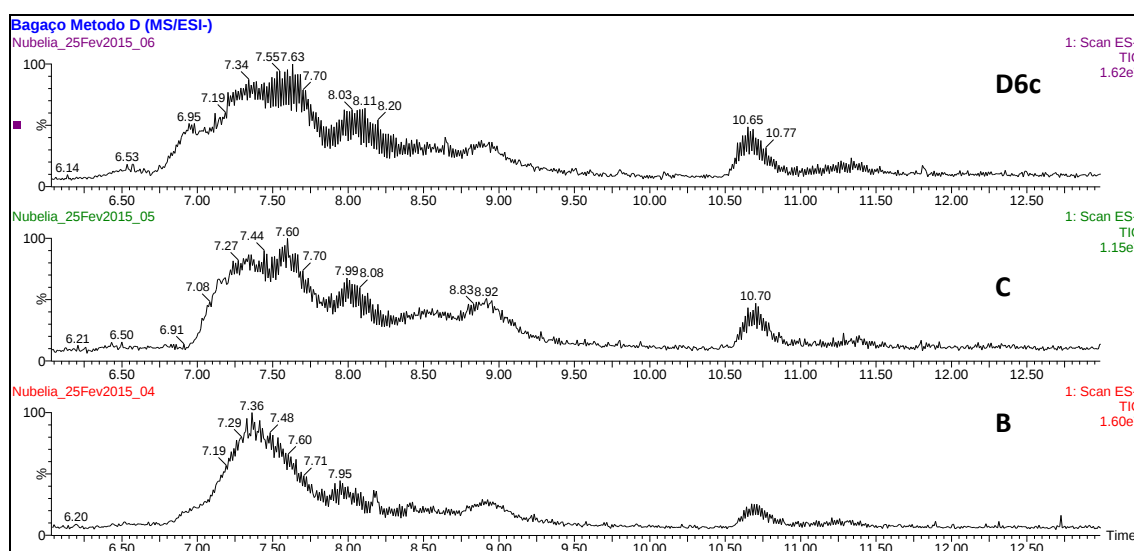


Fig. 24. Cromatogramas de corrente iónica total (TIC) para o extrato de bagaço (BV) tendo em conta os métodos de extração B, C e D6c

Da comparação dos resultados é possível concluir que o método B permite extrair um menor número de compostos.

Além desta amostra também se analisou por LC-MS os extratos da folha de videira obtidos pelos métodos B e C e os extractos de peles de uva obtidos pelos métodos A e B, como se pode observar nas Fig. 25 e 26 respectivamente.

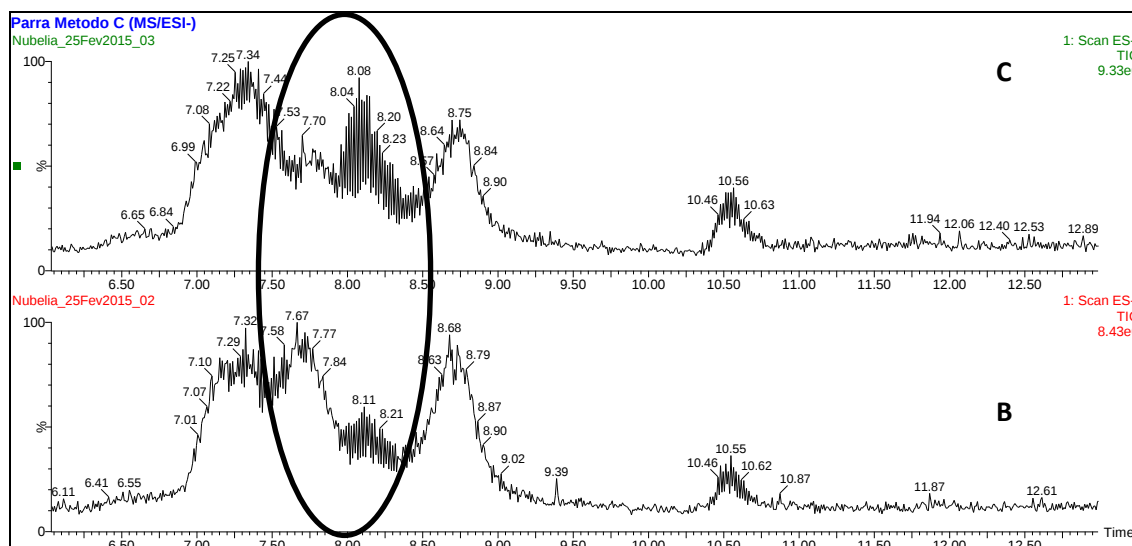


Fig. 25. Cromatogramas de corrente iónica total (TIC) para o extrato de folha de videira (FV) tendo em conta os métodos de extração B e C

Da comparação dos cromatogramas apresentados na figura 25 verifica-se que no intervalo de tempo de análise 7.50-8.50 os perfis cromatográficos são diferentes como assinalado na figura. Relativamente ao extracto das peles de uvas não se distinguem grandes diferenças quando se comparam os cromatogramas (Fig 26).

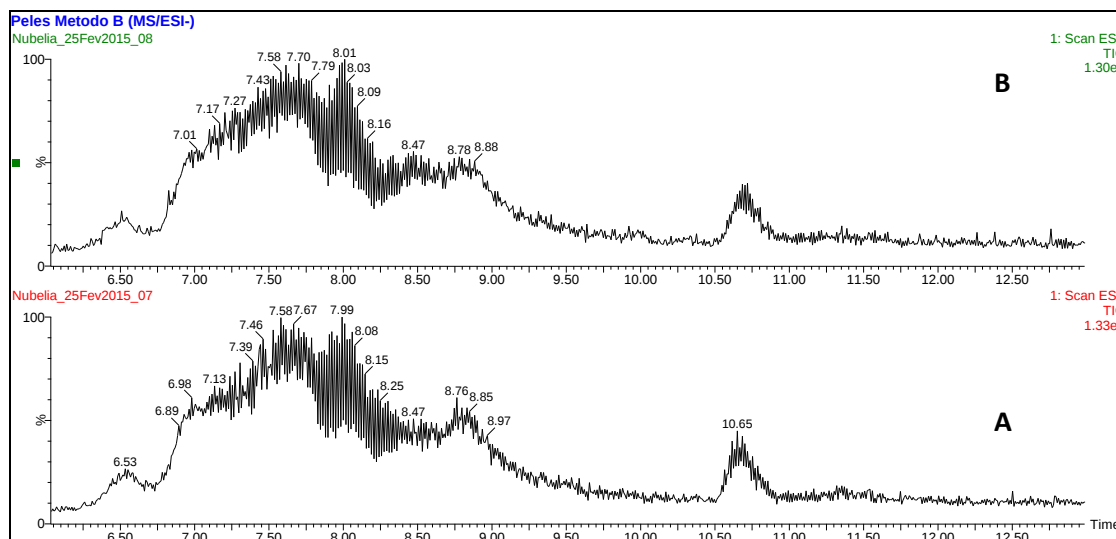


Fig. 26. Cromatogramas de corrente iónica total (TIC) para o extrato de peles de uva (P) tendo em conta os métodos de extração A e B

Na Fig. 27 comparamos os cromatogramas dos extratos de peles de uvas (P), bagaço de vinho (BV) e folha de videira (FV) e para o mesmo método de extração (B).

Observam-se algumas diferenças principalmente no intervalo de tempo de 7.00 a 9.00 min, conforme assinalado na figura.

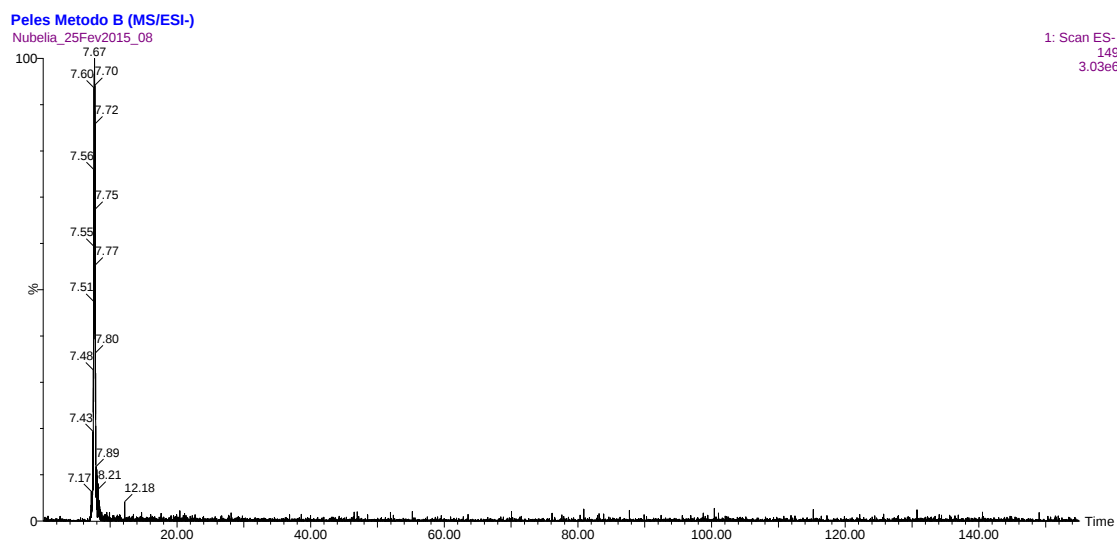


Fig. 28. Cromatograma do extrato P para $m/z=149$

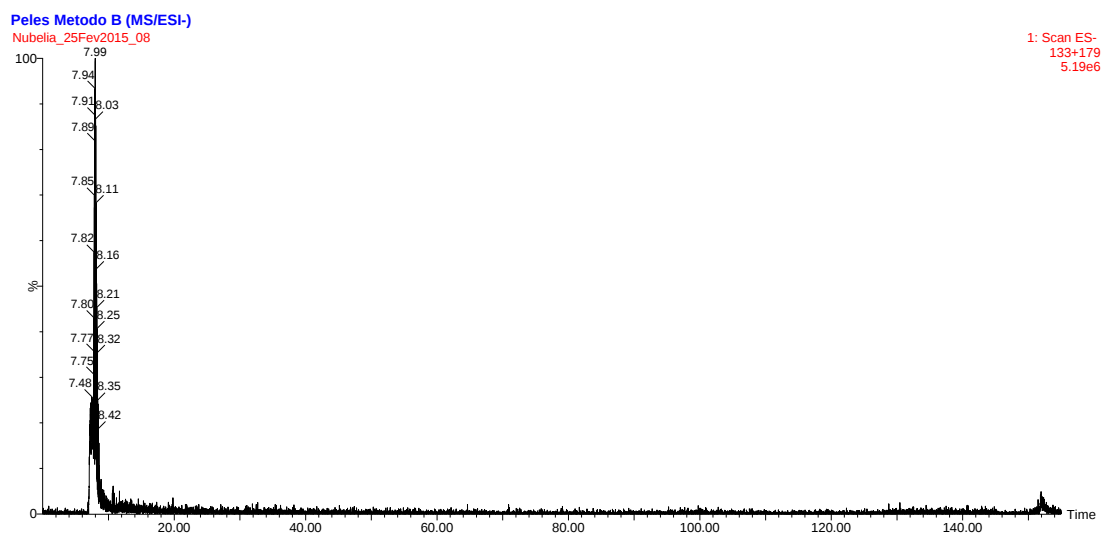


Fig. 29. Cromatograma do extrato P para $m/z=133$ e 179

Na **amostra BV** aos 7.346 min elui um pico de um composto não identificado em cujo espectro de massa (Fig. 30) são detectados os iões com m/z 341 e o respectivo aducto com m/z 381.

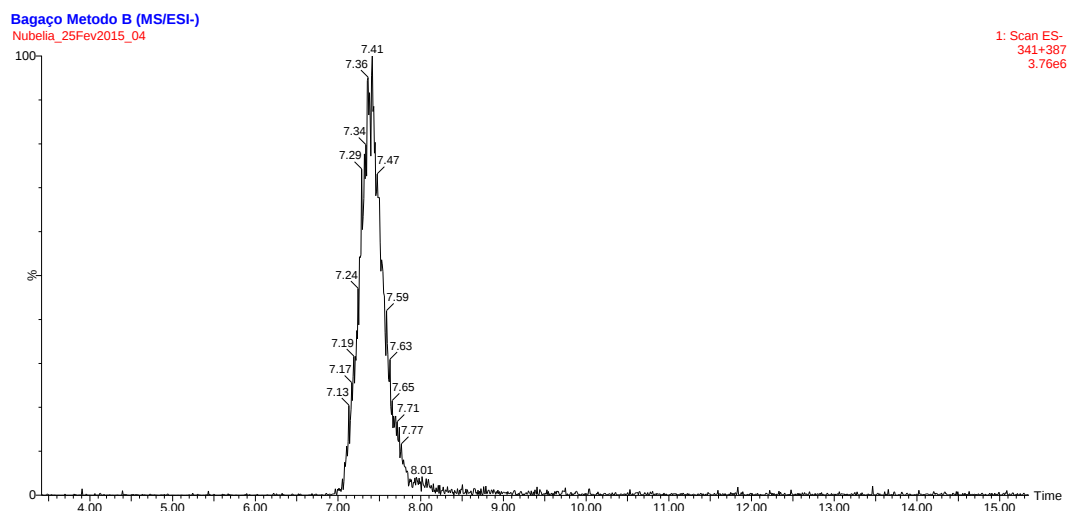


Fig.30. Cromatograma do extrato BV para m/z 341 e 381

Na **amostra FV** aos t_r 8.772 min eluem compostos que não estão identificados e que apresentam valores de MM de 160, 176, 274 e também um composto com MM=290 e que pode corresponder à catequina. Na Fig. 31 apresenta-se o cromatograma do ião extraído correspondente ao ião de $m/z=289$ (A), e o espectro de absorção do pico que elui aos 8.772 min (B). Este espectro apresenta um perfil característico dos flavan-3-ol (catequina) com um máximo de absorção a 270 nm.

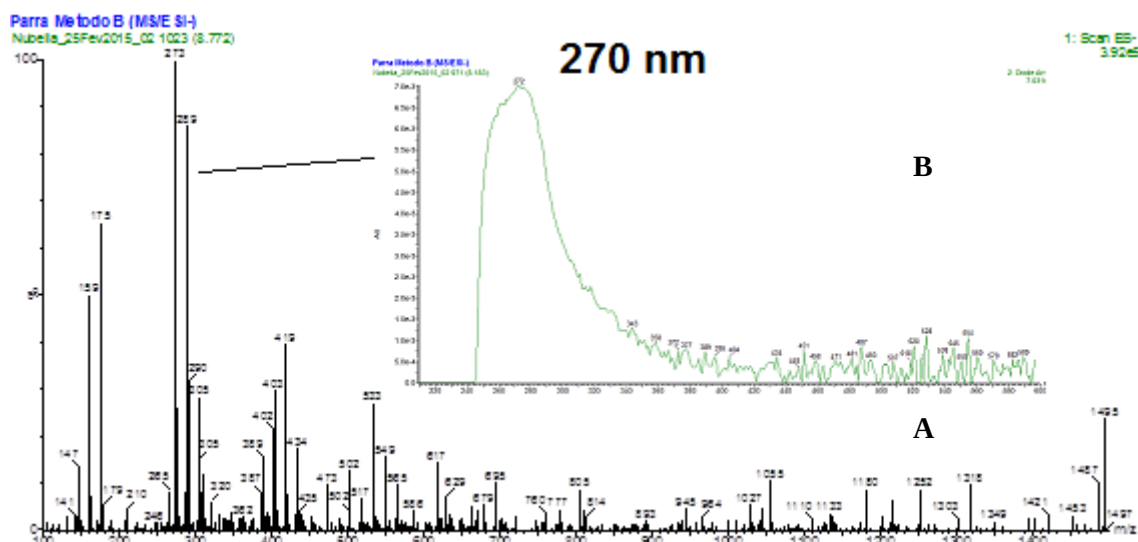


Fig. 31. Cromatograma do extracto FV para m/z 289 (A) e espectro de absorção (B)

Na Fig.32 comparam-se os cromatogramas da amostra BV em que se utilizam diferentes fases móveis (solvente A) : A - ácido fórmico a 0.5% e B ácido acético a 0.1%.

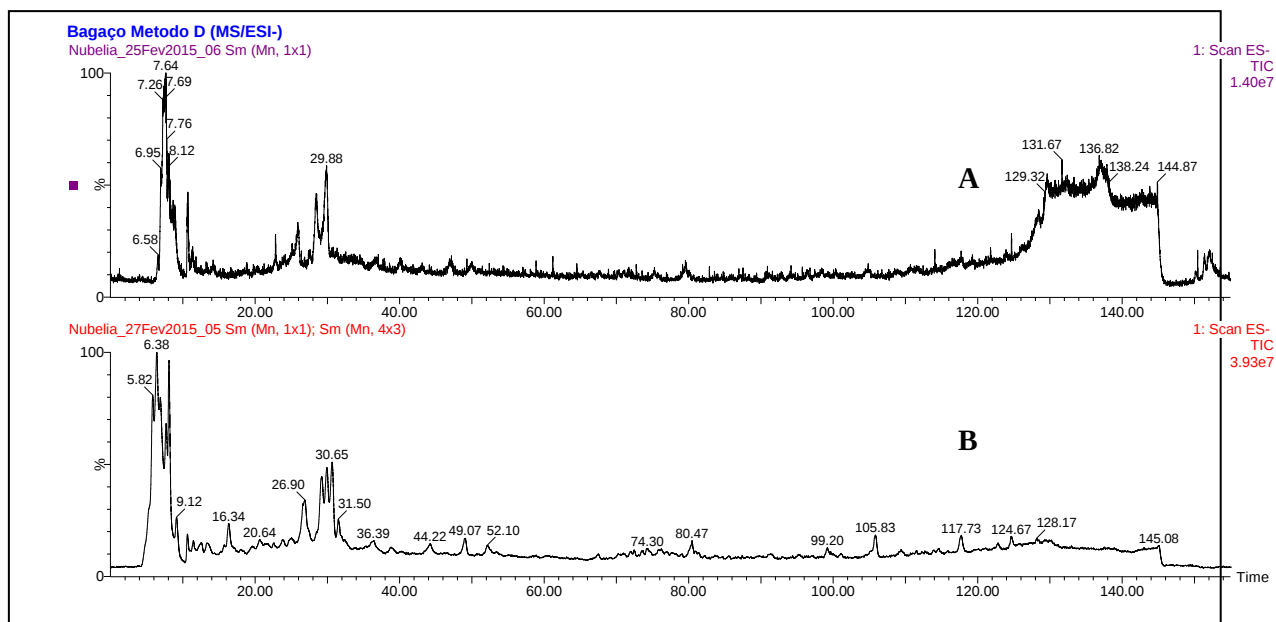


Fig. 32. Cromatogramas do extracto BV obtido pelo método C e fases móveis diferentes (A) ácido fórmico a 0.5% e (B) ácido acético a 0.1%

Ao se substituir o ácido fórmico (menor valor de pH) pelo ácido acético observa-se que os picos ficam mais simétricos, finos e intensos.

4. Considerações finais e perspectivas futuras

4.1. Considerações finais

Neste trabalho estudaram-se amostras de subprodutos da vinha e do vinho nomeadamente folha de videira, bagaço e peles de uva com o objetivo de proceder à sua caracterização química (teor em fenóis totais, flavonóides e taninos), antioxidante e também a uma caracterização química preliminar através da técnica LC-MS.

Em face do trabalho desenvolvido e dos resultados obtidos foi possível tirar algumas conclusões:

- As metodologias utilizadas na extração dos compostos mostraram-se adequadas aos objetivos pretendidos neste trabalho;
- Foram validados (linearidade, limite de deteção e quantificação, precisão e exactidão) com sucesso métodos analíticos (método Folin-Ciocalteu, flavonóides, ABTS e FRAP) que permitissem caracterizar quantitativamente a amostra de bagaço (BV);
- De uma forma geral o melhor método de extração de fenóis totais e de flavonóides foi o do Soxlet de 6 ciclos (D6c), sendo que a amostra com maior concentração de fenóis totais é o bagaço (BV).
- A amostra com maior concentração em taninos é a pele de uva (P) e a extração pelo método D6c (Soxlet 6 ciclos), permite de uma forma geral obter extratos mais concentrados;
- Usando o método de DPPH observa-se que o melhor método de extração foi o método A sendo que a amostra com maior atividade antioxidante foi o extrato P. Relativamente aos métodos FRAP e ABTS conclui-se de igual forma que o método Soxlet de 6 ciclos (método D6c) é o mais eficaz. No entanto a amostra com maior atividade antioxidante aplicando o método FRAP é a P, enquanto que pelo método de ABTS é a amostra FV;
- O vinho A apresenta um teor superior em fenóis totais e taninos do que o vinho B;
- Os resultados demonstram uma boa correlação entre o teor em fenóis totais e flavonóides totais para as amostras P, BV e U;

- Os resultados da avaliação da capacidade antioxidante das amostras comerciais efectuada pelos métodos ABTS, FRAP e DPPH mostravam que existia uma boa correlação com o teor em fenóis totais;
- O método A apresentou uma maior correlação entre os métodos FRAP e ABTS, enquanto que entre FRAP e DPPH tem-se o método C e entre ABTS e DPPH considera-se o método B;
- Os resultados preliminares de identificação dos compostos por LC-MS conduziram a duas propostas de identificação de compostos (ácido tartárico e catequina em alguns dos extratos analisados) e na detecção de alguns compostos não identificados, nomeadamente com $m/z=133$ e $m/z=341$.

4.2. Perspetivas futuras

Como trabalho futuro, propõe-se fazer um estudo mais exaustivo sobre a identificação dos compostos por LC-MS e quantificar os compostos detetados nas amostras, assim como fazer análises microbianas aos extratos obtidos.

Com os extratos obtidos também se poderia investir a nível de cosmética, produzindo cremes e gel de banho, a nível alimentar, produzindo bolachas, azeite ou vinhos, e a nível farmacêutico, seria interessante produzir cápsulas com estes componentes.

5. Referências Bibliográficas

- [1] CAMPOS, L. Obtenção de extratos de bagaço de uva Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*): Parâmetros de processo e modelagem matemática. 2005.
- [2] Riccardo Flamini, Fulvio Mattivi , Mirko De Rosso , Panagiotis Arapitsas and Luigi Bavaresco (2013), Advanced Knowledge of Three Important Classes of Grape Phenolics: Anthocyanins, Stilbenes and Flavonols
- [3] Moreno-Arribas, M., & Polo, M. (2009). Wine Chemistry and Biochemistry. Springer Science Business Media.
- [4] Senem Kamiloglu, Ayca Ayfer Pasli, Beraat Ozcelik, Esra Capanoglu (2013), Evaluating the in vitro bioaccessibility of phenolics and antioxidant activity during consumption of dried fruits with nuts.
- [5] Portal Laboratório virtual de processos químicos.
http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com_content&task=view&id=32&Itemid=141, 20.12.2015
- [6] Cornélio, E., Silva, M. (2013) Separação de Substâncias, Extração sólido-líquido
- [7] Mortazavi, S.; Mohammad H.; Mirzaei, H.; Jafari, M.; Golmohammad, F. (2010), Extraction of essential oils from *Bunium persicum* Boiss. using superheated water
- [8] Aelson Aloir Santana Brum, Lia Ferraz de Arruda e Marisa Aparecida Bismara Regitano-d'Arce (2009) Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal
- [9] Wettasinghe, M., & Shahidi, F. (1999). Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. *J Agric Food Chem* , 47, 1801-1812.
- [10] Angelo, P., & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* , 66 (1), 232-240.
- [11] Shahidi, F., & Naczk, M. (2005). Analysis of Polyphenols in Foods. In S. Ötles (Ed.), *Methods of Analysis of Food Components and Additives* (pp. 199-259). Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- [12] Stalikas, C. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* , 30, 3268–3295.
- [13] Soares, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr* , 15 (1), 71-81.

- [14]Shahidi, F., Janitha, P., & Wanasundara, P. (1992). Phenolics antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* , 32 (1), 67-103.
- [15] Adegoke, G., Vijay Kumar, M., Gopala Krishna, A. G., Varadaraj, M. C., Sambaiah, K., & Lokesh, B. R. (1998). Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. *J Food Sci Technol* , 35 (4), 283-398.
- [16] Rockenbach, I.; Gonzaga, L.; (2010)Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking
- [17] Tournour, H.; Magalhaes, L.; Barreiros, L.;Queiroz, L.; Cunha, M.; (2015) Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties
- [18] Broinizi, P., Andrade-Wartha, E., Silva, A., Novoa, A., Torres, R., Azedero, H., (2007). Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* , 27 (4), 902-908.
- [19] Ferrari, C. K. (1998). Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. *Rev. Nutr.* , 11 (1), 3-14.
- [20]Cadenas, C., & Packer, L. (2002).Handbook of Antioxidants.Chapter 20 – The Phenolic Wine Antioxidants.2nd Ed. Marcel Dekker, Inc. New York.
- [21]Moreno-Arribas, M., & Polo, M. (2009).Wine Chemistry and Biochemistry.Springer Science+Business Media. New York. 437-529.
- [22] Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A.,& Dubourdieu, D. (2006b). Handbook of Enology, Volume 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. 2nd Ed. John Wiley and Sons, Ltd. West Sussex.141-205.
- [23] Magalhães, L., Segundo, M., Reis, S., & Lima, J. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta* , 613, 1-19.
- [24] Drosou, C., Kyriakopoulou, K.; Bimpilas, A.; TsimogianniS, D.; (2015) A comparative study on different extraction techniques to recover redgrape pomace polyphenols from vinification byproducts
- [25] Magalhães, L., Segundo, M., Reis, S., & Lima, J. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta* , 613, 1-19.
- [26] Boots, A., Haenen, G., & Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology* , 585, 325-337.

- [27] Shami, N. J., & Moreira, E. A. (2004). Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutrição* , 17 (2), 227-236.
- [28] Rodrigo P, (2009), Phenolic Content and Antioxidant Activity of Moscatel Dessert Wines from the Setúbal Region in Portugal. *Food Anal. Methods* 2:149-161
- [29] Moreira, A. V., & Mancini-Filho, J. (2004). Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. *Rev Nutr* , 17 (4), 411-424.
- [30] Nakatani, N. (1996). Antioxidants from spices and herbs. *Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications* , 4, 64-75.
- [31] Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* , 53, 4290-4302.
- [32] MacDonald-Wicks, L., Wood, L., & Garg, M. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* , 86, 2046–2056.
- [33] Huang, D., Ou, B., & Prior, R. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- [34] Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S., Bektaşoğlu, K., & Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assay applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12, 1496-1547.
- [35] Tirzitis, G., & Bartosz, G. (2010). Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochimica Polonica*, 57, 139-142.
- [36] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1998). Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- [37] Jackson, R. (2008). *Wine Science, Principles and Applications*. 3rd Ed.
- [38] Deshpande, S. S.; Cheryan, M.; Salunkhe, D. K.; *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2006
- [39] Mendes, A. *Implementação e Validação de Métodos Analíticos* (2011)
- [40] BRITO, N. el, al, (2003) *Validação de métodos analíticos: Estratégia e Discussão*.
- [41] Deshpande, S. S.; Cheryan, M.; Salunkhe, D. K.; *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2006
- [42] Rondeau, P.; Gambier, F; Jolibert, F.; Brosse, N., (2012) *Compositions and chemical variability of grape pomaces from French vineyard*

Anexo A

ABTS –Padrão de Trolox

Preparação de soluções padrão

- Preparar uma solução padrão de Trolox 100mg/L em metanol.
- Preparar soluções (0.4; 1.5; 2.5; 4; 6; 10; 15; 20; 25; 50; 75 mg/L) a partir da solução anterior.
- Ler a abs a 734 e 754nm

Flavonóides- Padrão de Catequinas

Preparação de soluções padrão

- Preparar uma solução padrão de catequina em metanol (5000 mg/L).
- Preparar soluções padrão de catequina (10, 35, 60, 80, 110, 130, 150 mg/L) a partir da anterior em que:
 - ✓ Mistura um volume de catequina com 57μL de NaN_2 a 7% e misturar por 6 minutos.
 - ✓ Adiciona 150μL de AlCl_3 a 10%, e deixa a solução em repouso por 5 minutos.
 - ✓ Adiciona 0,5mL de NaOH (1M) e ajusta o volume para 2.5 mL com água destilada.
- Ler a absorvância a 510 nm.

Fenóis totais – Padrões de ácido Gálgico

Tabela 1 - Concentrações de soluções padrão de ácido gálgico para posterior elaboração da curva de calibração.

Concentração da solução de ácido gálgico (mg/L)	Volume (ácido gálgico) 100 mg/L
	Balão volumétrico de 5mL
0,0	0,0
0,4	0,02 mL(20µL)
0,6	0,03mL (30µL)
1,0	0,05 mL (50µL)
2,0	0,10 mL (100µL)
3,2	0,16 mL (160µL)
4,0	0,20 mL (200µL)

3. A cada um dos balões volumétricos adicionar os reagentes indicados na tabela 2.
Agitar após cada adição.

Tabela 2- Volumes dos reagentes a pipetar consoante os volumes finais.

Reagente	Volume a pipetar dos reagentes
	Balão volumétrico de 5 mL
H ₂ O	2,5 mL
Reagente Folin-Ciocalteu	0,25 mL (250µL)
Solução de Na ₂ CO ₃ 20%	1,0 mL

4. Completar o volume do balão volumétrico com água.
5. Agitar e deixar em repouso ao abrigo da luz durante 30 minutos.
6. Ler e a absorção a 750nm numa célula espetofotométrica de 1cm.

Anexo B

Resultados Validação

Fenóis totais

1- Linearidade

Concentração em ácido gálico (ppm)	Absorvância
0	0
	0
	0
0.4	0.049
	0.048
	0.052
0.6	0.063
	0.063
	0.06
1.0	0.111
	0.113
	0.116
2.0	0.251
	0.252
	0.254
3.2	0.455
	0.451
	0.453
4.0	0.537
	0.533
	0.536
6.0	0.821
	0.824
	0.826

2- Determinação do LQ e LD

Absorvância padrão
0.072
0.075
0.072
0.075
0.073
0.074
0.074
0.074
0.074
0.073

3- Precisão

3.1 Repetibilidade

Concentração (ppm)	Absorvância
2.0	0.249
	0.249
	0.251
	0.250
	0.253
	0.249

3.2 Precisão intermédia

Concentração em ácido gálico (ppm)	Absorvância		
	1º ensaio	2º ensaio	3º ensaio
2.0	0.251	0.249	0.248
	0.252	0.249	0.245
	0.254	0.251	0.247
4.0	0.537	0.537	0.537
	0.533	0.533	0.533
	0.536	0.538	0.536
6.0	0.821	0.811	0.819
	0.824	0.813	0.817
	0.826	0.810	0.820

4- Exatidão

Concentração em ácido gálico (ppm)	Absorvância	Absorvância
2.0	0.251	0.441
	0.252	0.453
	0.254	0.451
4.0	0.537	0.707
	0.533	0.705
	0.536	0.709
6.0	0.827	0.998
	0.829	0.999
	0.828	0.997

Amostras	Absorvância	Absorvância
1.93	0.257	0.440
	0.255	0.444
	0.258	0.442
3.98	0.541	0.709
	0.544	0.713
	0.54	0.712
5.98	0.821	0.979
	0.819	0.975
	0.818	0.977

Flavonóides

1- Linearidade

Concentração em catequina (ppm)	Absorvância
0	0
	0
	0
35	0.199
	0.198
	0.201
40	0.261
	0.266
	0.264
50	0.349
	0.353
	0.351
60	0.378

	0.377
	0.379
75	0.496
	0.499
	0.497
90	0.591
	0.595
	0.593
110	0.762
	0.765
	0.763
130	0.899
	0.901
	0.899
150	0.991
	0.988
	0.992

2- Determinação do LQ e LD

Absorvância padrão
0.055
0.055
0.055
0.055
0.054
0.055
0.055
0.055
0.055
0.055

3- Precisão

3.1 Repetibilidade

Concentração em catequina (ppm)	Absorvância
75	0.496
	0.499
	0.497
	0.494
	0.498
	0.497

3.2 Precisão intermédia:

Concentração em catequina (ppm)	1º ensaio	2º ensaio	3º ensaio
75	0.496	0.495	0.497
	0.499	0.494	0.498
	0.497	0.498	0.496
110	0.762	0.764	0.763
	0.765	0.762	0.762
	0.763	0.764	0.764
150	0.771	0.782	0.769
	0.772	0.778	0.772
	0.768	0.776	0.773

4- Exatidão

Concentração em catequina (ppm)	Absorvância	Absorvância
2.0	0.251	0.441
	0.252	0.453
	0.254	0.451
4.0	0.537	0.707
	0.533	0.705
	0.536	0.709
6.0	0.827	0.998
	0.829	0.999
	0.828	0.997

Amostras

1.93	0.257	0.44
	0.255	0.444
	0.258	0.442
3.98	0.541	0.709
	0.544	0.713
	0.54	0.712
5.98	0.821	0.979
	0.819	0.975
	0.818	0.977

FRAP

1- Linearidade

Concentração em trolox (ppm)	Absorvância
0	0.023
	0.022
	0.025
4.0	0.064
	0.069
	0.066
7.0	0.101
	0.099
	0.095
15.0	0.176
	0.174
	0.174
20.0	0.202
	0.203
	0.205
35.0	0.315
	0.312
	0.311
50.0	0.459
	0.453
	0.455
60.0	0.569
	0.564
	0.563
75.0	0.662
	0.660
	0.665

2- Determinação do LQ e LD

Absorvância padrão
0.092
0.092
0.092
0.092
0.092
0.092
0.092
0.092
0.092
0.092
0.092

3- Precisão

3.1 Repetibilidade:

Concentração em trolox (ppm)]	Absorvância
15	0.176
	0.174
	0.174
	0.175
	0.177
	0.173

3.2 Precisão intermedia:

Concentração em trolox (ppm)]	1º ensaio	2º ensaio	3º ensaio
7.0	0.101	0.099	0.100
	0.099	0.098	0.102
	0.095	0.102	0.103
25.0	0.256	0.251	0.255
	0.255	0.254	0.253
	0.259	0.255	0.257
75.0	0.839	0.839	0.854
	0.830	0.837	0.848
	0.836	0.837	0.851

4- Exatidão

Concentração em trolox (ppm)	Absorvância	Absorvância
7.0	0.101	0.215
	0.099	0.218
	0.095	0.213
35.0	0.315	0.417
	0.312	0.421
	0.311	0.416
75.0	0.662	0.709
	0.660	0.711
	0.665	0.708

Amostras	Absorvância	Absorvância
7.601	0.093	0.22
	0.091	0.218
	0.094	0.219
36.4	0.339	0.418
	0.342	0.423
	0.340	0.421
74.85	0.669	0.714
	0.674	0.718
	0.670	0.721

ABTS

1- Linearidade

Concentração em trolox (ppm)]	Absorvância
0	0.689
	0.691
	0.691
0.4	0.654
	0.650
	0.653
1.5	0.532
	0.534
	0.533
2.5	0.452
	0.451
	0.449
3.5	0.301
	0.305
	0.303
4.5	0.213
	0.209
	0.210
6.0	0.090
	0.094
	0.091
7.0	0.006
	0.009
	0.008

2- Determinação do LQ e LD

Absorvância padrão
0.052
0.052
0.052
0.052
0.052
0.051
0.052
0.052
0.052
0.052

3- Precisão

3.1 Repetibilidade

Concentração em trolox (ppm)]	Absorvância
2.5	0.452
	0.451
	0.449
	0.451
	0.450
	0.448

3.2 Precisão intermedia:

Concentração em trolox (ppm)]	1º ensaio	2º ensaio	3º ensaio
0.4	0.651	0.651	0.653
	0.654	0.652	0.652
	0.653	0.653	0.653
2.5	0.452	0.45	0.453
	0.451	0.448	0.455
	0.449	0.447	0.45
6.0	0.090	0.089	0.09
	0.094	0.09	0.092
	0.091	0.088	0.094

4- Exatidão

Concentração em trolox (ppm)	Absorvância	Absorvância
0.4	0.654	0.664
	0.650	0.661
	0.653	0.664
2.5	0.452	0.466
	0.451	0.461
	0.449	0.461
6.0	0.090	0.094
	0.094	0.096
	0.091	0.094

Amostras	Absorvância	Absorvância
0.38	0.648	0.660
	0.642	0.659
	0.646	0.662
2.25	0.459	0.464
	0.461	0.467
	0.458	0.463
6.14	0.072	0.079
	0.075	0.081
	0.070	0.077

Teor em fenóis totais

Amostras	Absorvância
FV método A	0.568
	0.565
	0.566
FV método B	0.703
	0.700
	0.704
FV método C	0.532
	0.531
	0.534
U método A (diluição 100)	0.216
	0.210
	0.212
U método B (diluição 100)	0.286
	0.280
	0.280
U método C (diluição 100)	0.338
	0.342
	0.340
BV método A	0.460
	0.480
	0.450
BV método B	0.401
	0.405
	0.403
BV método C	0.201
	0.201
	0.203
P método A	0.184
	0.186

	0.181
P método B	0.709
	0.712
	0.708
	0.708
P método C	0.209
	0.213
	0.214
Vinho A (diluição 100)	0.242
	0.244
	0.246
Vinho B (diluição 100)	0.220
	0.220
	0.230
BV método D 3c (diluição 400)	0.557
	0.558
	0.560
BV método D 6c (diluição 100)	0.597
	0.596
	0.592
P método D3c	0.487
	0.489
	0.488
P método D 6c	0.583
	0.581
	0.583
U método D 3c	0.398
	0.397
	0.399
U método D 6c	0.507
	0.508
	0.508
FV método D 3c	0.764
	0.766
	0.763
FV método D 6c (diluição 400)	0.547
	0.548
	0.547

Teor em flavonóides totais

Amostras	Absorvância
FV método A	0.466
	0.465
	0.466
FV método B	0.673
	0.678
	0.675
FV método C (diluição 200)	0.199
	0.200
	0.198
U método A (diluição 25)	0.196
	0.200
	0.198
U método B (diluição 25)	0.195
	0.202
	0.204
U método C (diluição 50)	0.214
	0.210
	0.214
BV método A (diluição 25)	0.245
	0.245
	0.242
BV método B	0.222
	0.227
	0.225
BV método C (diluição 50)	0.203
	0.206
	0.204
P método A (diluição 25)	0.359
	0.362
	0.360
P método B (diluição 50)	0.401
	0.400
	0.398
P método C (diluição 25)	0.360
	0.364
	0.361
Vinho A (diluição 25)	0.404
	0.404
	0.408
Vinho B	0.640
	0.636

(diluição 25)	0.640
BV método D 3c (diluição 500)	0.196
	0.198
	0.197
BV método D 6c (diluição 500)	0.203
	0.207
	0.206
P método D 3c (diluição 500)	0.530
	0.534
	0.532
P método D 6c (diluição 100)	0.444
	0.442
	0.444
U método D 3c (diluição 100)	0.319
	0.318
	0.320
U método D 6c (diluição 100)	0.412
	0.410
	0.413
FV método D 3c (diluição 100)	0.545
	0.545
	0.546
FV método D 6c (diluição 100)	0.651
	0.655
	0.653

Teor em Taninos

Amostras	Absorvância
U método A	0.031
	0.031
	0.033
U método B	0.037
	0.036
	0.036
U método C	0.031
	0.032
	0.032
BV método A	0.030
	0.032
	0.030
BV método B	0.039
	0.038
	0.040

BV método C	0.033
	0.031
	0.031
P método A	0.032
	0.039
	0.028
P método B	0.036
	0.041
	0.036
P método C	0.033
	0.031
	0.036
Vinho A (diluição 1:10)	0.059
	0.061
	0.064
Vinho B (diluição 1:10)	0.055
	0.053
	0.056
BV método D 3c	0.029
	0.025
	0.028
BV método D 6c	0.033
	0.032
	0.036
P método D 3c	0.029
	0.028
	0.030
P método D 6c	0.043
	0.044
	0.042
U método D 3c	0.030
	0.032
	0.031
U método D 6c	0.033
	0.031
	0.035

DPPH

Amostras*	Absorvância t ₀	Absorvância t ₁₆
FV método A	0.429	0.087
	0.423	0.085
	0.423	0.085
FV método B	0.459	0.175
	0.464	0.171
	0.464	0.169
FV método C	0.687	0.150
	0.685	0.151
	0.686	0.151
U método A	0.435	0.060
	0.431	0.055
	0.439	0.059
U método B	0.411	0.242
	0.415	0.245
	0.411	0.243
U método C	0.827	0.357
	0.825	0.357
	0.827	0.355
BV método A	0.454	0.203
	0.447	0.199
	0.450	0.198
BV método B	0.480	0.264
	0.472	0.262
	0.476	0.269
BV método C	0.779	0.376
	0.783	0.369
	0.780	0.374
P método A	0.450	0.219
	0.449	0.217
	0.451	0.220
P método B	0.060	0.018
	0.050	0.014
	0.046	0.011
P método C	0.947	0.293
	0.948	0.297
	0.946	0.295
Vinho A	0.574	0.304
	0.578	0.302
	0.573	0.300
Vinho B	0.578	0.291
	0.580	0.295

	0.582	0.299
BV método D 3c	0.666	0.373
	0.668	0.376
	0.668	0.374
BV método D 6c	0.577	0.305
	0.578	0.3
	0.575	0.304
P método D 3c	0.740	0.414
	0.741	0.415
	0.744	0.418
P método D 6c	0.653	0.316
	0.654	0.313
	0.650	0.311
U método D 3c	0.528	0.197
	0.529	0.201
	0.526	0.2
U método D 6c	0.436	0.156
	0.437	0.154
	0.437	0.157
FV método D 3c	0.425	0.253
	0.429	0.258
	0.430	0.255
FV método D 6c	0.519	0.258
	0.521	0.257
	0.520	0.257

* Diluição 1:4

FRAP

Amostras	Absorvância
FV método A (diluição 300)	0.354
	0.358
	0.352
FV método B (diluição 300)	0.443
	0.447
	0.442
FV método C (diluição 300)	0.322
	0.329
	0.327
U método A (diluição 75)	0.318
	0.312
	0.318

U método B (diluição 75)	0.374
	0.372
	0.372
U método C (diluição 75)	0.210
	0.206
	0.206
BV método A (diluição 15)	0.238
	0.235
	0.238
BV método B (diluição 150)	0.372
	0.375
	0.370
BV método C (diluição 15)	0.385
	0.382
	0.384
P método A (diluição 75)	0.198
	0.200
	0.196
P método B (diluição 300)	0.228
	0.225
	0.229
P método C (diluição 150)	0.280
	0.278
	0.282
Vinho A (diluição 100)	0.252
	0.246
	0.249
Vinho B (diluição 100)	0.222
	0.221
	0.219
BV métodoD3c (diluição 500)	0.428
	0.432
	0.429
BV métodoD6c (diluição 500)	0.499
	0.498
	0.497
P métodoD3c (diluição 500)	0.441
	0.445
	0.443
P métodoD6c (diluição 1000)	0.328
	0.329
	0.328
U métodoD3c	0.430
	0.428

(diluição 500)	0.427
U métodoD6c (diluição 500)	0.444
	0.442
	0.445
	0.445
FV métodoD3c (diluição 500)	0.358
	0.354
	0.355
FV métodoD6c (diluição 500)	0.377
	0.381
	0.379

ABTS

Amostras	Absorvância
FV método A	0.024
	0.020
	0.023
FV método B	0.021
	0.022
	0.021
FV método C	0.019
	0.021
	0.018
U método A	0.352
	0.356
	0.353
U método B	0.019
	0.020
	0.023
U método C	0.092
	0.097
	0.093
BV método A	0.464
	0.460
	0.462
BV método B (diluição 300)	0.020
	0.022
	0.019
BV método A	0.206
	0.209
	0.205
	0.289

P método A	0.285
	0.288
P método B	0.063
	0.065
	0.062
P método C	0.022
	0.019
	0.022
Vinho A	0.248
	0.249
	0.246
Vinho B	0.271
	0.273
	0.270
BV método D 3c	0.033
	0.035
	0.034
BV método D 6c	0.027
	0.030
	0.026
P método D 3c	0.039
	0.035
	0.038
P método D 6c (diluição 500)	0.031
	0.030
	0.034
U método D 3c (diluição 500)	0.045
	0.044
	0.048
U método D 6c (diluição 500)	0.032
	0.035
	0.032
FV método D 3c (diluição 500)	0.014
	0.011
	0.013
FV método D 6c (diluição 500)	0.011
	0.009
	0.008