

2011/2012

Bárbara Matos Nº 1060605



Valorização de Subprodutos da Vinha e do Vinho: impacto do tempo e métodos de preservação nas suas características

Orientadores no ISEP:

Professora Doutora Cristina Delerue Matos

Doutora Maria de Fátima Barroso

Orientadores na WeDoTech

Doutora Teresa Oliveira

Agradecimentos

É de facto impossível reconhecer, individualmente, todos os professores, colegas e amigos que contribuíram para a realização deste trabalho, a quem estendo os meus agradecimentos e consideração.

É com profunda gratidão que agradeço às minhas orientadoras no ISEP, a Doutora Cristina Matos e a Doutora Fátima Barroso pela sua orientação, atenção e apoio dado ao longo deste ano lectivo.

Um reconhecimento muito grande à empresa Wedotech em especial à Doutora Teresa Oliveira por terem proporcionado a realização deste trabalho.

Um muito obrigado à Susana Machado, Andreia Reis e Andreia Coelho pela ajuda paciência e companhia revelada ao longo de todo o trabalho. Não posso também esquecer o Engenheiro Tomás Albergaria que foi sempre prestável comigo.

Agradeço ao grupo de trabalho do GRAQ por toda a ajuda.

Um obrigado especial à minha amiga Marlene pela ajuda e paciência ao longo deste período exigente de trabalho.

Aos meus pais, José e Olinda, um agradecimento especial, por tudo o que me têm proporcionado na vida e por me darem a possibilidade de sonhar. Ao meu namorado António, pelo seu apoio incondicional e pela força que me deu nos momentos em que as forças falharam.

Resumo

Os polifenóis constituem um grupo biologicamente relevante de compostos naturais, que têm gerado um crescente interesse por parte dos consumidores e das indústrias alimentar, farmacêutica e de cosméticos. Os compostos fenólicos exibem uma vasta gama de propriedades fisiológicas, tais como anti-alérgica, anti-aterogénica, anti-inflamatória, anti-microbiana, antioxidante, anti-trombótica, possuindo efeitos cardio-protetores e vasodilatadores. Por conseguinte, o interesse na obtenção destes compostos ativos de uma forma fácil, barata e rápida tem vindo a aumentar.

Uma das fontes de polifenóis são os subprodutos agrícolas, tais como os produtos derivados do vinho e/ou processamento de uvas. As folhas, os caules e os resíduos obtidos durante o processo de produção do vinho têm sido subutilizados, apesar de representarem uma boa fonte de compostos antioxidantes e bioativos.

Portugal é um dos mais importantes países produtores de vinho, onde todos os anos são geradas várias toneladas de subprodutos associados a esta indústria. A extração, caracterização, quantificação e avaliação da atividade antioxidante de compostos bioativos extraídos destes subprodutos são, pois, tarefas importantes a fim de avaliar o potencial de utilização destes produtos como novas fontes de compostos antioxidantes.

O objetivo deste trabalho foi quantificar e avaliar os teores de polifenóis de extratos preparados a partir de folhas e caules de videira, e bagaço, engaço e grainha de uva. Os parâmetros experimentais da extração foram otimizados, incluindo a proporção de solvente de extração (água/etanol), a temperatura e o tempo de extração. A quantificação dos polifenóis (como fenóis totais e flavonoides) foi efetuada por espectrofotometria de UV/Vis.

Verificou-se que a melhor razão de solventes extratores foi de 50/50 (v/v) em água/etanol para todos os subprodutos estudados.

No caso dos subprodutos folhas e caules, as condições ideais de extração foram obtidas quando se usou uma temperatura de 40°C e um tempo de extração de 30 min. Para o bagaço, a temperatura ideal foi de 55°C durante 5 min. Para o engaço e grainha a utilização de uma temperatura de 40°C durante 5 min e 30 min, respetivamente, revelou-se o ideal para se obter os compostos.

Com este trabalho conclui-se que os subprodutos da vinha e do vinho efetivamente possuem compostos de elevado valor e com capacidade antioxidante.

Palavras-chave: vinha, vinho, subprodutos, antioxidantes, fenóis, flavonoides, poder reductor, DPPH.

Abstract

Polyphenols are a group of biologically relevant natural compounds, which have generated a growing interest among consumers, and in the pharmaceutical and cosmetic industries. The phenolic compounds exhibit a wide range of physiological properties such as antiallergic, anti-atherogenic, anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant, anti-thrombotic, having cardioprotective and vasodilator effects. Therefore, the interest in obtaining those active compounds in an easy, cheap and fast way has been increasing.

One of the sources of polyphenols are agricultural by-products, such as grapevine and wine byproducts. The leaves, the stems and the residues obtained during the production of wine are underused, although they represent a good source of antioxidants and bioactive compounds.

Portugal is one of the most important wine-producing countries, where every year several tons of by-products associated with this industry are generated. The extraction, characterization, quantification and evaluation of the antioxidant activity of bioactive compounds extracted from these by-products are therefore important tasks in order to evaluate the potential use of these products as a new source of antioxidant compounds.

The aim of this study was to quantify and evaluate the contents of polyphenols of extracts prepared from leaves, stems, pomace, stalks and grape pips. The experimental parameters of extraction were optimized including the extraction solvent ratio (water/ethanol), temperature and extraction time. Quantification of polyphenols (as total phenols and flavonoids) was performed by UV/Vis spectrophotometry.

It was found that the best ratio of solvent for extractions was of 50/50 (v/v) water/ethanol for all by-products studied.

In the case of leaves and stems, the ideal conditions for extraction were obtained when we used a temperature of 40 °C and an extraction time of 30 minutes. For pomacee, the optimum temperature was 55 °C for 5 minutes. Finally, for stalks and pips, the use of a temperature of 40 °C for 5 minutes and 30 minutes, respectively, proved to be ideal in obtaining the compounds.

This work allows one to conclude that the by-products of the vine and wine actually have compounds of major value and antioxidant capacity.

Keywords: vine, wine, byproducts, antioxidants, phenols, flavonoids, reducing power, DPPH.

Índice

1.	Introdução	1
1.1.	Empresa.....	1
1.2.	História do Vinho.....	1
1.3.	Produção do Vinho.....	2
1.4.	O vinho como fonte de riqueza em Portugal.....	5
1.5.	Antioxidantes.....	6
1.6.	Compostos Fenólicos.....	7
1.7.	Flavonóides.....	9
1.8.	Relação entre estrutura química e atividade antioxidante	9
1.9.	Condições de extração.....	11
1.9.1.	Método colorimétrico de Folin-Ciocalteu.....	12
1.9.2.	Flavonoides.....	12
1.9.3.	Actividade anti-radicalar: Método DPPH.....	13
1.9.4.	Poder Redutor.....	14
1.10.	Estado da arte.....	14
2.	Materiais e métodos	19
2.1.	Reagentes e Soluções	19
2.2.	Equipamentos e Materiais	19
2.3.	Procedimentos	19
2.3.1	Extracção	19
2.4.	Método de Folin-Ciocalteu (Fenóis totais)	20
2.5.	Flavonóides Totais	21
2.6.	DPPH.....	21
2.7.	Poder redutor	21
3.	Resultados e Discussão	23
3.1.	Capacidade antioxidante total de folhas de videira.....	23
3.2.	Capacidade antioxidante total de caules de videira	27
3.3.	Capacidade antioxidante total de bagaço.....	30
3.4.	Capacidade antioxidante do engaço	33
3.5.	Capacidade antioxidante da grainha	36
3.6.	Capacidade antioxidante dos subprodutos da vinha e do vinho	39
4.	Conclusões e Sugestões para trabalhos futuros	41

5. Bibliografia	43
A. Resultados experimentais	46

Índice de Figuras

Figura 1.1: Etapas da produção de vinho branco pelo processo de bica aberta. Adaptado (Cardoso, 2007)	2
Figura 1.2: Valores de produção de vinho em Portugal.	5
Figura 1.3: Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos.	8
Figura 1.4: Estrutura química dos flavonóides e benefícios associados a estes compostos. Adaptado http://cientifico.cardiol.br/cardiosource2/doenca-art-ronaria/int_artigo20.asp?cod=108 ,	9
Figura 1.5: Reação entre o radical DPPH e uma espécie antioxidante.	13
Figura 3.1: Capacidade antioxidante das folhas obtida variando a razão água/etanol para 30 min a 25°C.	24
Figura 3.2: Capacidade antioxidante total dos extratos das folhas obtida pelos diferentes métodos óticos em função do tempo (30 e 60 min) e para as temperaturas de 25°C (A), 40°C (B), 55°C (C) e 100°C (D).	25
Figura 3.3: Capacidade antioxidante total dos extratos das folhas de videira. (A) - Fenóis totais; (B) - Flavonóides totais; (C) - Poder redutor; (D) – Atividade anti-radicalar DPPH.	26
Figura 3.4: Capacidade antioxidante total dos caules obtida variando a razão de solventes extratores (água/etanol) para 30 min a 25°C.	27
Figura 3.5: Capacidade antioxidante total dos extratos de caules obtida pelos diferentes métodos óticos em função do tempo (30 e 60 min) e para as temperaturas de 25°C (A), 40°C (B), 55°C (C) e 100°C (D).	28
Figura 3.6: Capacidade antioxidante total dos extratos dos caules de videira. (A) - Fenóis totais; (B) - Flavonóides totais; (C) - Poder redutor; (D) - atividade anti-radicalar DPPH	29
Figura 3.7: Capacidade antioxidante total do bagaço obtida variando a razão de solventes extratores (água/etanol) para 30 min a 25°C.	30
Figura 3.8: Capacidade antioxidante total dos extratos do bagaço obtida pelos diferentes métodos óticos em função do tempo (5, 15, 30 e 60 min), para 25°C (A), 40°C (B), 55°C (C) e 100°C (D).	31
Figura 3.9: Capacidade antioxidante do bagaço obtida por cada método em função da temperatura. (A) - Fenóis totais; (B) - Flavonóides totais; (C) - Poder redutor; (D) - atividade anti-radicalar DPPH.....	32
Figura 3.10: Capacidade antioxidante do engaçõ obtida variando a razão água/etanol para 30 min a 25°C.....	33

Figura 3.11: Capacidade antioxidante total dos extratos do engaço obtida pelos diferentes métodos óticos em função do tempo (5,15, 30 e 60 min) para 25 (A), 40 (B), 55 (C) e 100°C (D).....	34
Figura 3.12: Capacidade antioxidante total do engaço. (A) - Fenóis totais; (B) - Flavonóides totais; (C) - Poder redutor; (D) - atividade anti-radicalar DPPH.....	35
Figura 3.13: Capacidade antioxidante da grainha obtida variando a razão água/etanol para 30 min a 25°C.....	36
Figura 3.14: Capacidade antioxidante total dos extratos de grainha obtida pelos diferentes métodos óticos em função do tempo (5,15, 30 e 60 min) para 25 (A), 40 (B), 55 (C) e 100°C (D).....	37
Figura 3.15: Capacidade antioxidante total da grainha (A) - Fenóis totais; (B) - Flavonóides totais; (C) - Poder redutor; (D) - atividade anti-radicalar DPPH.....	38
Figura 3.16: Capacidade antioxidante total para os vários sub-produtos obtidos nas condições de extração ideais.	39

Índice de tabelas

Tabela 1.1: Classe de compostos fenólicos nas plantas. Adaptado de (Balasundram <i>et al</i> ; 2006).....	8
Tabela 1.2: Técnicas de extração de compostos fenólicos. Adaptado de Silva <i>et al</i> ; 2010 e de Cataneo <i>et al</i> ; 2008.	11
Tabela 1.3: Técnicas de extração e identificação, compostos ou grupos de compostos identificados e os seus teores, no bagaço de COUDERC 13 e de PINOT GRIS. Adaptado de (Cataneo <i>et al</i> ; 2008).....	16
Tabela 1.4: Teores de capacidade antioxidante total obtidos em diferentes tipos de uvas. Adaptado de (Fu <i>et al</i> ; 2011).....	17
Tabela 1.5: Condições experimentais para a extração de antioxidantes do sumo de uva. Adaptado de (Vedana <i>et al</i> ; 2008).....	18
Tabela 2.1: Volume de etanol e água usado na extração dos compostos antioxidantes das folhas e caules.	20
Tabela 2.2: Volume de etanol e água usado na extração dos compostos antioxidantes do bagaço, engaço e grainha.	20
Tabela 3.1: Curvas de calibração para os quatro métodos utilizados.	23
Tabela 3.2: Condições de extração ideais para os diferentes sub-produtos utilizados.	39
Tabela A.1: Condições de extração e teores médios de fenóis, flavonóides, poder redutor e DPPH nas folhas.	46
Tabela A.2: Condições de extração e teores médios de fenóis, flavonóides, poder redutor e DPPH nos caules.	47
Tabela A.3: Condições de extração e teores médios de fenóis, flavonóides, poder redutor e DPPH no bagaço.....	48
Tabela A.4: Condições de extração e teores médios de fenóis, flavonóides, poder redutor e DPPH no engaço.....	49
Tabela A.5: Condições de extração e teores médios de fenóis, flavonóides, poder redutor e DPPH na grainha.	51

1. Introdução

1.1. Empresa

A WeDoTech é uma empresa de base tecnológica, que tem como finalidade colocar no mercado tecnologias inovadoras, limpas, sustentáveis e competitivas com elevado valor científico nas áreas da engenharia e biotecnologia. O trabalho maioritário é direcionado para a área agroalimentar e ambiental, sendo que também presta serviços de consultoria técnica.

Esta empresa é constituída na sua maioria por pessoas doutoradas com uma vasta e importante experiência industrial, o que se revela uma grande vantagem e uma mais-valia, uma vez que se traduz na adequação dos trabalhos a desenvolver aos interesses tecnológicos e de mercado. (<http://www.wedotech.eu/wedotech.php>)

1.2. História do Vinho

A produção de vinho remonta a aproximadamente 6 000 a.C. Acredita-se que a origem do vinho terá ocorrido nos atuais territórios da Geórgia ou do Irão. Relativamente ao seu aparecimento na Europa, este terá ocorrido há aproximadamente 6500 anos, nas atuais Bulgária ou Grécia, tendo-se tornado muito comum na Grécia e Roma antigas. (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Vinho>)

Em Portugal, a produção de vinho é anterior à fundação da nacionalidade. Considera-se que a vinha foi plantada pela primeira vez na Península Ibérica, nos vales do Tejo e do Sado, cerca de 2000 a.C. pelos Tartessos. Após a fundação de Portugal, o vinho tornou-se no produto mais exportado. Nos séculos XV e XVI, com as descobertas portuguesas, as barricas de vinho eram usadas como lastro nas naus e caravelas que transportavam os produtos trazidos do Brasil e do Oriente. Com o tratado de Methwen, celebrado em 1703, estabeleceram-se condições especiais para a penetração do vinho português em Inglaterra e as exportações de vinho tiveram um aumento considerável. Em 1756, o vinho do Porto era já tão famoso que no sentido de regular o comércio foi criada a primeira região demarcada do mundo, a região produtora do vinho do Porto, no Alto Douro. No século XIX, a praga da filoxera, um insecto da família dos Afidídeos, oriundo da América do Norte, dizimou largas áreas de vinhas portuguesas. No princípio do século XX, várias regiões vinícolas foram demarcadas e com a adesão de Portugal à União Europeia, em 1986, as regiões vinícolas foram redefinidas, tendo-se criadas novas regiões vinícolas. (<http://www.portugalweb.pt/>)

1.3. Produção do Vinho

O vinho é uma bebida alcoólica resultante da fermentação do mosto de uvas frescas, sãs e maduras, conseguida por intermédio de microrganismos (leveduras), os quais transformam o açúcar do sumo da uva em álcool etílico, dióxido de carbono e uma série de produtos secundários em quantidades variadas.

O processo de produção do vinho branco encontra-se esquematizado na Figura 1.1

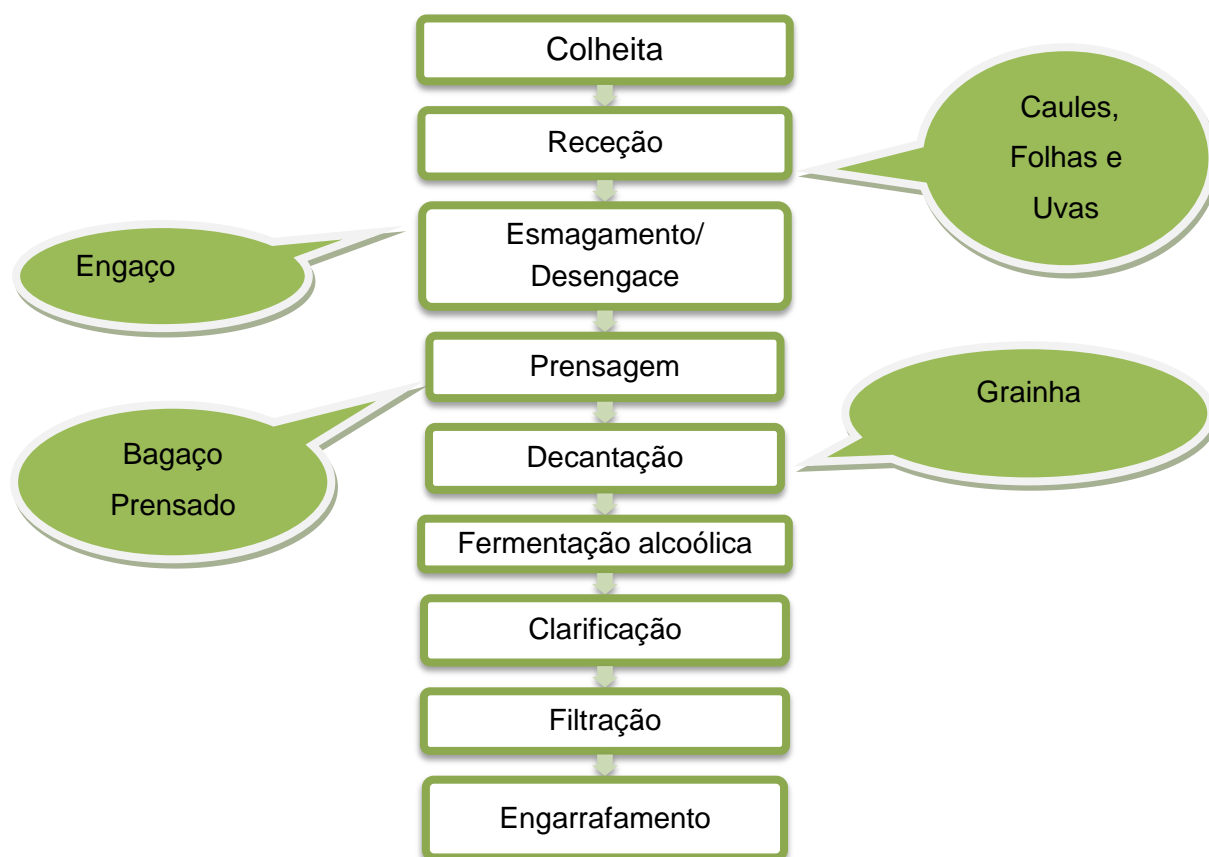


Figura 1.1: Etapas da produção de vinho branco pelo processo de bica aberta. Adaptado (Cardoso, 2007)

De seguida encontram-se explicitadas de uma forma sucinta as etapas necessárias para a produção de vinho.

Colheita

Denomina-se vindima a operação da colheita de uva para a vinificação. O momento da colheita depende de vários fatores, sendo os mais importantes, o estado sanitário e o grau de maturação das uvas que dependerá do tipo de vinho que será produzido. Para que as uvas cheguem ao local de fabricação sãs e maduras deve-se ter alguns cuidados,

nomeadamente, o transporte deve ser rápido e deve-se evitar o esmagamento das uvas, o que provocaria a oxidação e maceração. De modo a garantir que o mosto não entra antecipadamente em fermentação, as uvas devem ser processadas logo que cheguem ao lagar.

Um dos aspetos mais importantes a considerar é o grau de maturação das uvas. Nos últimos dias de amadurecimento, o bago de uva sofre um aumento da quantidade de açúcares e uma redução dos ácidos. Ao mesmo tempo que se seleccionam os bagos são dos podres ou secos, devem-se retirar as folhas, os ramos e outros materiais indesejáveis à produção de um vinho de qualidade. Após a colheita das uvas, vão permanecer na vinha os subprodutos 1 e 2: folhas e caules. Estes subprodutos podem-se tornar em resíduos.

Receção

Na etapa de receção das uvas no lagar é importante que sejam mantidas as condições higiénicas adequadas quer nos tanques, quer em todo o material usado no processo de fabrico e ainda nos vasilhames para armazenamento do vinho.

Desengace/ Esmagamento

O desengace tem por objetivo separar o engaço dos bagos antes de entrarem no reator/tanque onde decorrerá a fermentação, visto que estes conferem ao vinho um sabor desagradável. O engaço (subproduto 3) provoca ainda alterações na temperatura de fermentação e na acidez do mosto.

A etapa de esmagamento consiste no processo de trituração de uvas, resultando na libertação de mosto pela rutura das películas, pois sem esta operação, a fermentação não teria início.

Prensagem

A prensagem é uma operação que consiste na extração do mosto/sumo das uvas, sendo indispensável ao processo de vinificação. Esta operação é feita através de uma prensa, que esmaga as uvas com o objectivo de retirar todo o líquido que se encontra nos bagos, utilizando o mínimo de força possível para se obter uma extração suave e eficiente. Neste processo obtém-se o bagaço prensado (subproduto 4).

(http://www.aesbuc.pt/twt/etgi/myfiles/meussites/enologia/2005/prensagem_vt.htm)

Decantação

No processo de decantação, o vinho entra em contacto com o oxigénio o que provoca uma aceleração da maturação. Com a decantação ocorre uma intensificação dos aromas da fruta e diminuição, através da evaporação, do teor alcoólico do vinho.

Fermentação alcoólica

Designa-se por fermentação alcoólica o fenómeno que transforma o mosto em vinho, o que corresponde essencialmente à reação dos açúcares com libertação de CO₂ o qual emerge à superfície do líquido (mosto). Este processo inicia-se após o esmagamento das uvas.

Sabe-se que a fermentação é provocada por fermentos – as leveduras. As leveduras são muito abundantes nas uvas, na época da vindima e encontram-se espalhados sobre a película da uva, no engaço e por toda a vinha. A temperatura ótima para que ocorra a fermentação deve manter-se à volta de 25 °C. Quando a temperatura é superior a 33 °C, o desenvolvimento das bactérias torna-se mais eminente, competitivo e rápido, o que leva ao decréscimo da atividade das leveduras e à deterioração do vinho.

Clarificação

A clarificação é a operação que tem por fim eliminar todas as substâncias em suspensão e outras em dissolução existentes nos vinhos, para os tornar límpidos e cristalinos. Normalmente, os vinhos são e que sofreram uma vinificação adequada estão límpidos no mês de dezembro, pois o repouso e as baixas temperaturas do inverno são suficientes para os clarificar. Um vinho turvo não deixa apreciar a cor e pode apresentar um mau sabor, devido à sensação que as partículas sólidas deixam na língua. A clarificação pode também ser feita através de colas (colagem).

Filtração

É a operação mecânica por meio da qual um vinho turvo, passado através de corpos porosos, se separa das partículas que estão em suspensão. A filtração substitui ou completa a ação das trasfegas e das colagens.

Engarrafamento

Nenhum vinho deve ser bebido imediatamente após ter sido engarrafado. Este deve ser deixado repousar de um a três meses dependendo do tipo de vinho. O engarrafamento por mais cuidadoso que seja, causa uma perturbação no vinho. Por exemplo, o ar pode atuar

como oxidante. Determinados vinhos passam por um envelhecimento adicional em garrafa, mais ou menos longo, antes de serem comercializados.

A finalidade da rolha de cortiça é garantir o suprimento de ar na quantidade exata para que o vinho amadureça no ritmo certo. A cor das garrafas deve ser preferencialmente escura, verde ou castanha, de modo a impedir que a incidência de luz possa exercer uma ação negativa sobre a estabilidade do vinho.

1.4. O vinho como fonte de riqueza em Portugal

Em Portugal, o vinho é um produto com uma grande importância económica, social e cultural. Em 2010, segundo dados estatísticos, a produção apresentou um aumento de 22% face à vindima anterior, situando-se nos 6,9 milhões de hectolitros de mosto, valor acima da média dos últimos 5 anos (Figura 1.2). Em 2010, a superfície destinada à produção de vinho era de 178 749 ha.

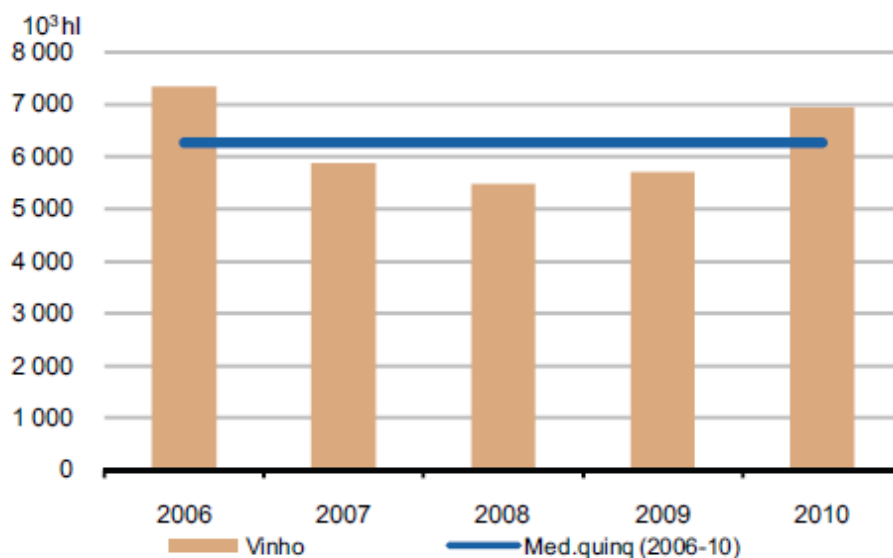


Figura 1.2: Valores de produção de vinho em Portugal.

Embora o vinho tenha grande importância na economia portuguesa, a indústria do vinho e da vinha gera vários subprodutos que têm sido subaproveitados. Os subprodutos apresentam cada vez mais interesse do ponto de vista ambiental e, principalmente, económico. Esta importância torna-se ainda mais relevante quando um setor tem elevado peso na economia de um país, como é o sector vitivinícola.

Segundo Santos e Campos (1986), o tratamento de subprodutos agrícolas está a merecer cada vez maior atenção, tendo em vista o seu aproveitamento, o aumento da

produtividade, a criação de riqueza e a despoluição do ambiente. Em numerosos casos, e sempre que possível, pretende-se agregar todos estes propósitos.

Em Portugal a produção de vinho atinge uma expressão económica considerável, com uma produção média anual de 7.000.000 hl de vinho, o que corresponde a uma vinificação de 10.000.000 ton/ano de uvas. Costa e Belchior (1972) referem que para produzir 100 litros de vinho branco obtém-se 31,17 kg de subprodutos, e 25 kg para o mesmo volume de vinho tinto.(Silva *et al*; 2010)

Por tal facto, o aproveitamento dos subprodutos secundários da vinificação tem nestes últimos anos merecido a atenção dos responsáveis pela política vitivinícola. Assim sendo, torna-se importante conhecer a sua contribuição e respetiva composição dos subprodutos. Estudos realizados indicam que os subprodutos vinícolas possuem compostos de elevado valor, como por exemplo, antioxidantes.

Considerando todos estes factos, é de todo o interesse (quer económico quer ambiental) estudar a composição química destes subprodutos bem como avaliar as melhores condições para a extração dos compostos de interesse, e determinar os seus teores e características. Desta forma, será possível verificar se existe potencial económico para a valorização destes subprodutos. Atualmente, estão publicados alguns trabalhos neste domínio, mas poucos foram realizados em Portugal, pelo que ainda há muito a fazer nesta área.

1.5. Antioxidantes

Tal como já foi referido, um dos grupos de compostos com mais interesse que surgem nos subprodutos agrícolas, é o que apresenta capacidade antioxidante. Um antioxidante (HX) é qualquer substância capaz de retardar ou impedir danos devidos à oxidação, estando presentes em pequenas quantidades quando comparados com o agente oxidante (R[·]). As equações 1.1 e 1.2 representam as reações químicas da ação protetora promovida pelos antioxidantes.



O sistema de defesa antioxidante divide-se em sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático. A nível endógeno, os principais antioxidantes enzimáticos são:

- 1) a superóxido dismutase (SOD) que remove o O₂^{·-} (radical superóxido);
- 2) a catalase que converte e elimina o H₂O₂ a H₂O e O₂ (redução);

3) a glutathione peroxidase que combinada com o H_2O_2 ajuda a remover e a prevenir a formação do radical hidroxilo (OH^\bullet), contra o qual não existe sistema de defesa, sendo importante para a manutenção da integridade celular.

Por sua vez, o sistema não enzimático inclui compostos sintetizados ou ingeridos pelo organismo humano. Nestes incluem-se hormonas sexuais, a melatonina (hormona ligada ao sistema neurológico), a Coenzima Q, o ácido úrico, entre outros. Através da dieta alimentar o organismo pode ainda suprir-se de outros antioxidantes não enzimáticos tais como: o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E), o β -caroteno (precursor da vitamina A) e fito-fenóis (flavonóides), pelo consumo de fruta, vegetais, chá, café, vinho, etc.

Tendo em conta a solubilidade dos antioxidantes, eles podem dividir-se em duas classes, antioxidantes hidrofílicos e hidrofóbicos.

Das várias classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, aqueles que têm suscitado mais interesse são os compostos fenólicos, uma vez que inibem a peroxidação lipídica. Já foram encontrados mais de 8000 compostos fenólicos em plantas, sendo que estes podem dividir-se em dois grandes grupos, os flavonóides e os não flavonóides.

Existem vários estudos que defendem que a ingestão de vegetais e frutas apresenta uma relação inversa com o risco de doenças crónicas, tais como doenças cardiovasculares e cancro. Os antioxidantes naturais presentes nos vegetais e nos frutos, tais como as vitaminas e polifenóis são considerados responsáveis por esses benefícios para a saúde. (Fu *et al*; 2011)

1.6. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos comportam-se como antioxidantes, devido à capacidade de doar hidrogénio ou electrões, e por possuírem radicais intermediários estáveis que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lípidos. (Silva *et al*; 2010)

Estruturalmente os compostos fenólicos possuem um anel aromático (anel benzénico) com um ou mais substituintes hidroxilo (ligados diretamente à estrutura cíclica) e variam desde moléculas simples a compostos altamente polimerizados. Na Figura 1.3, encontra-se ilustrada a estrutura química dos ácidos hidroxibenzoicos (compostos fenólicos simples).

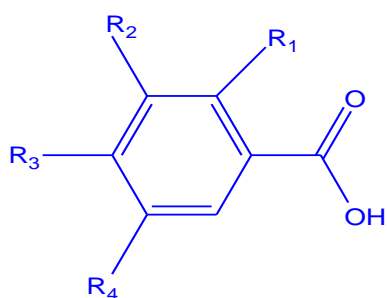


Figura 1.3: Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos.

Os compostos fenólicos desempenham um papel importante no crescimento e reprodução das plantas, fornecendo uma elevada proteção contra organismos patogénicos e predadores, além de contribuírem para as características de cor e sensoriais de frutas e produtos hortícolas. Estes compostos exibem uma ampla gama de propriedades fisiológicas, nomeadamente, anti-alérgicas, anti-inflamatórias, anti-microbianas, antioxidantes, entre outras. Os compostos fenólicos têm sido considerados como um dos principais grupos com elevado potencial antioxidante dos alimentos, tendo assim um impacto positivo para a saúde humana, em especial daqueles que consomem quantidades mais elevadas de frutas e produtos hortícolas. (Balasundram *et al*; 2006)

Os compostos fenólicos podem ser classificados em várias classes tais como as que se encontram representadas na Tabela 1.1. (Balasundram *et al*; 2006)

Tabela 1.1: Classe de compostos fenólicos nas plantas. Adaptado de (Balasundram *et al*; 2006)

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, Benzoquinonas	C_6
Ácido Hidroxibenzóico	C_6-C_1
Acetofenonas, Ácidos Fenilacéticos	C_6-C_2
Ácidos hidroxicinâmicos, Fenilpropanóides (cumarinas, isocumarinas, cromonas, cromenos)	C_6-C_3
Naftoquinonas	C_6-C_4
Xantononas	$C_6-C_1-C_6$
Estilbenos, Antraquinonas	$C_6-C_2-C_6$
Flavonóides, Isoflavonóides	$C_6-C_3-C_6$
Lígnanos, Neolígnanos	$(C_6-C_3)_2$
Biflavonóides	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Lígninas	$(C_6-C_3)_n$
Taninos condensados (proantocianidinas ou flavolonas)	$(C_6-C_3-C_6)_n$

1.7. Flavonóides

Os flavonóides são um subgrupo importante dos compostos fenólicos, cuja estrutura se encontra representada na Figura 1.4. Estes são compostos que apresentam baixo peso molecular e encontram-se em diversas espécies vegetais. As mudanças estruturais nos anéis subdividem os flavonóides em várias famílias, sendo que esses grupos diferem uns dos outros pelo grau de insaturação. A ingestão de produtos que possuam flavonóides ajuda a melhorar a disfunção endotelial, contribui para a diminuição da pressão arterial, do colesterol, da agregação plaquetária e proporciona uma maior sensibilidade à insulina.

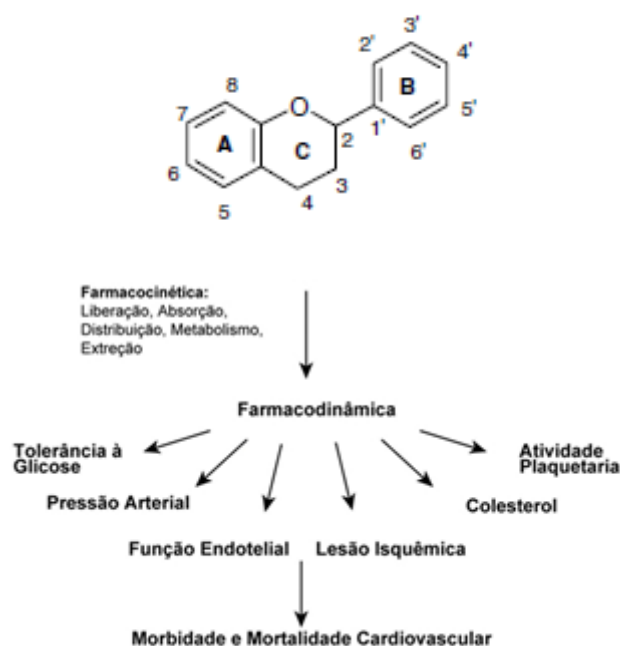


Figura 1.4: Estrutura química dos flavonóides e benefícios associados a estes compostos. Adaptado http://cientifico.cardiol.br/cardiosource2/doenca-arteronaria/int_artigo20.asp?cod=108,

1.8. Relação entre estrutura química e atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é caracterizada por vários fatores, tais como, a capacidade de eliminar ou inativar os radicais livres, doar átomos de hidrogénio ou electrões, ou catiões metálicos. A estrutura dos compostos fenólicos é determinante para retirar os radicais e os metais com atividade quelante, sendo este referido como a relação estrutura-atividade (SAR, (Q)SAR, (*quantitative*) *structure-activityrelationship*). Por exemplo, no caso dos ácidos fenólicos, a atividade antioxidante depende do número e da posição dos

grupos hidroxilo em relação ao grupo funcional carboxilo. O crescente grau de hidroxilação provoca um aumento na atividade antioxidante dos ácidos fenólicos.

A relação estrutura-atividade dos flavonóides, por norma é mais complexa do que a de ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos, devido à complexidade das moléculas de flavonóides.(Balasundram *et al*; 2006)

1.9. Condições de extração

De modo a fazer o aproveitamento dos compostos de maior valor existentes nos subprodutos do vinho e da vinha é necessário recorrer a etapas de extração. No processo extrativo há que ter em consideração determinados fatores, tais como, a promoção do contacto entre a mistura extratora e o sólido, a temperatura, o tempo de contacto e ainda a seleção de solventes. É importante recorrer a solventes não tóxicos e de baixo preço. Na Tabela 1.2 encontram-se descritas algumas técnicas e condições de extração usadas para a extração de compostos antioxidantes em vegetais.

Tabela 1.2: Técnicas de extração de compostos fenólicos. Adaptado de Silva *et al.*; 2010 e de Cataneo *et al.*; 2008.

Solução extratora	Tempo de extração	Temperatura de extração	Outras informações
Etanol	-	-	Soxhlet seguido por purificação por cromatografia em coluna de sílica e carvão ativado (1:0,5)
Etanol	6h	-	Soxhlet, purificação por partição com éter de petróleo e acetona seguida por precipitação com acetato de chumbo
Metanol	-	Ambiente	Agitação magnética, partição com hexano e clarificação com hidróxido de bário e sulfato de zinco
Acetona e água desionizada (0,25,50,75 e 100%)	Durante a noite	4-10 °C	-
Acetona 70%	20 min	4 °C	Centrifugação
Éter etílico	1 h	Ambiente	Agitação magnética e filtração sob vácuo
Metanol 100%	12 h	Ambiente	Agitação magnética
96% <i>n</i> -hexano, acetona, acetato de etilo, etanol e metanol	15 h	-	Soxhlet
Etanol-água (80/20) e metanol-água (50-50)	2 h	-	Agitador orbital, recuperação do extrator por filtração sob vácuo e evaporação do solvente num evaporador rotativo
Solução aquosa de Na ₂ SO ₃ a 2,5%	1 h	90 °C	Reator de vidro com agitação mecânica
Acetona 80%	2 h	-	Agitação mecânica ao abrigo total da luz.

Vários métodos analíticos têm sido desenvolvidos com a finalidade de determinar a capacidade antioxidante em alimentos, bebidas e amostras biológicas.

Os métodos desenvolvidos, de uma forma geral, analisam o comportamento de um determinado antioxidante relativamente a um radical gerado. A atividade antioxidante é posteriormente calculada tendo como referência um padrão.

1.9.1. Método colorimétrico de Folin-Ciocalteu

Na generalidade, o teor de fenóis totais pode ser determinado pelo método espectrofotométrico de *Folin-Ciocalteu*. O reagente de Folin-Ciocalteu consiste na mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotungstico, no qual o molibdénio e o tungsténio se encontram no estado de oxidação VI. Porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados complexos de molibdénio azul e tungsténio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre V e VI. Neste ensaio colorimétrico, a persistência da coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras. A reação colorimétrica do reagente *Folin-Ciocalteu* na presença de fenóis encontra-se evidenciada pelas equações 1.3 e 1.4

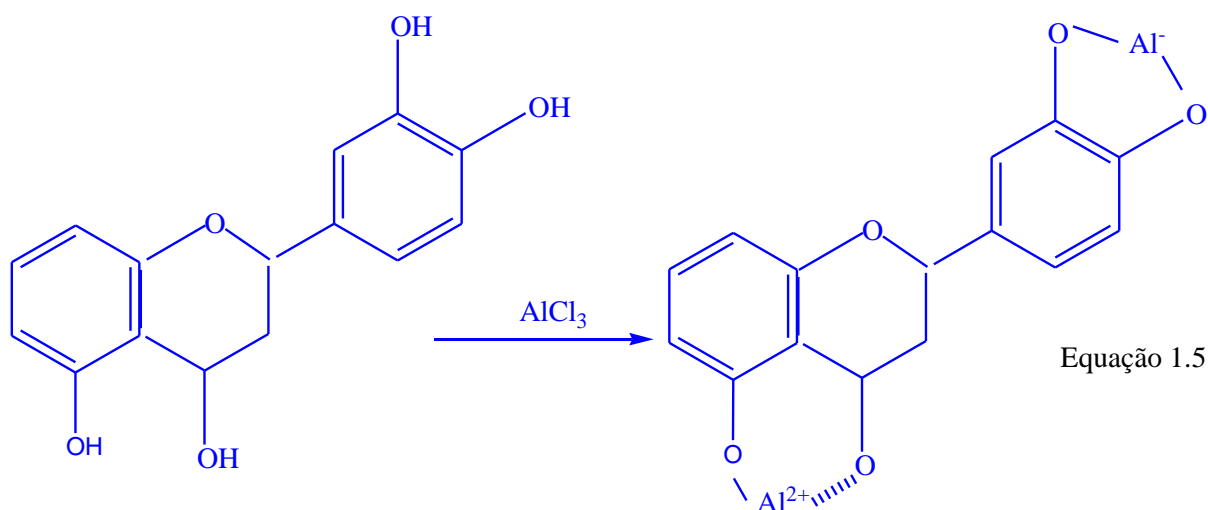


Neste método é necessário a utilização de uma curva de calibração, sendo o padrão mais utilizado o ácido gálico. Este foi um dos métodos utilizados nos ensaios que foram realizados com amostras de folhas, caules, bagaço, engaço e grainha de uvas.

O método sofre a interferência de várias substâncias, particularmente açúcares, aminas aromáticas, enxofre, ácidos orgânicos, ácido ascórbico e redutores, e a eliminação dos interferentes deve ser feita previamente.

1.9.2. Flavonoides

Os flavonoides foram quantificados pelo método do cloreto de alumínio. Este método baseia-se na capacidade que o catião Al^{3+} tem em formar complexos estáveis com os grupos carbonilo e hidroxilo dos flavonoides (Equação 1.5). Esta técnica não sofre interferências dos compostos fenólicos (muito comuns e em maiores quantidade nas amostras), pois a reação espectrofotométrica do complexo flavonóide-Al ocorre a comprimentos de onda maiores e com uma intensificação da absorvância.



1.9.3. Actividade anti-radicalar: Método DPPH

Em 1922, Goldschmidt e Renn descobriram um radical livre estável de cor violeta, que agora é usado como reagente colorimétrico para processos oxidação-redução. O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) pode ser mantido indefinidamente com pouca decomposição porque ele não reage com o oxigênio. O método é útil para determinar as propriedades antioxidantes de aminas, fenóis ou compostos naturais (vitaminas, extratos vegetais, medicamentos) e para inibir reações hemolíticas.

O método DPPH usa uma solução alcoólica de DPPH que absorve no comprimento de onda de 517 nm. À medida que o elétron deixa de ser desemparelhado, a absorção decresce e ocorre a mudança de cor em presença de moléculas antioxidantes. Na Figura 1.5 encontra-se representada a reação entre o radical DPPH e uma espécie antioxidante.

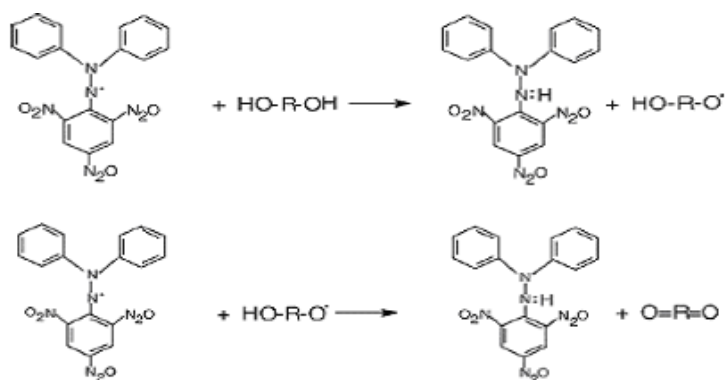


Figura 1.5: Reação entre o radical DPPH e uma espécie antioxidante.

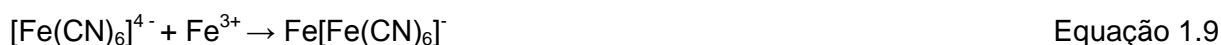
As vantagens do método DPPH são:

- avaliar uma grande quantidade de amostras num período curto de tempo;
- um método sensível que deteta pequenas concentrações do ativo testado;
- permitir avaliar antioxidantes lipofílicos, já que o solvente do processo é metanol ou etanol.

Este método apresenta como contrapartida, o pH do meio reacional, que é em torno dos 5,5, ser diferente do pH fisiológico, o que constitui numa desvantagem pela dificuldade de transferir os resultados para as condições *in-vivo*. (Cataneo *et al*; 2008)

1.9.4. Poder Redutor

O teste do poder redutor implica uma reação de redução como o próprio nome indica. Através deste método monitoriza-se a transformação de Fe(III) em Fe(II), promovida pelos antioxidantes existentes na amostra. Na composição do reagente hexacianoferrato (III) estão presentes as espécies Fe(III) ou $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, quando estas são reduzidas a Fe (II) ou a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ respetivamente, tendem a combinar-se e a dar origem ao $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. As equações, 1.6 a 1.9, explicam sob o ponto de vista reacional o funcionamento deste teste.



1.10. Estado da arte

Na literatura, existem vários artigos que reportam a avaliação da capacidade antioxidante total do vinho ou de subprodutos do processo de vinificação. Conforme se pode observar na Tabela 1.3, o bagaço tinto da uva Pinot Gris apresenta teores de compostos fenólicos, de flavonoides e de capacidade antioxidante superiores aos existentes no bagaço branco da uva couderc13. (Cataneo *et al*; 2008)

Um outro estudo relata a capacidade antioxidante e o teor de compostos fenólicos em uvas verdes, vermelhas e de mesa (Tabela 1.4). Observa-se que as uvas que apresentam teores fenólicos e capacidades antioxidantes mais elevadas são as uvas de mesa, seguidas das uvas vermelhas e por fim as uvas verdes. (Fu *et al*; 2011)

A Tabela 1.5 apresenta diferentes formas de se efetuar a extração de compostos antioxidantes existentes no sumo de uva. Tal como se pode visualizar, vários fatores podem interferir no rendimento da extração, tais como, o tipo e percentagem da mistura extratora, o tempo de contacto entre o solvente e o sumo de uva e a temperatura à qual ocorre a extração. Os autores verificaram que com o aumento do tempo de extração, o teor de polifenóis diminuiu no extrato aquoso, enquanto nos extractos metanólicos ou etanólicos o conteúdo de polifenóis aumentou com o tempo de extração. Relativamente ao efeito da temperatura, estes autores concluíram que o aquecimento das sementes de uva favorece a libertação de compostos fenólicos, o que aumentou a quantidade de compostos ativos nos extratos. (Vedana *et al*; 2008)

Tabela 1.3: Técnicas de extração e identificação, compostos ou grupos de compostos identificados e os seus teores, no bagaço de COUDERC 13 e de PINOT GRIS. Adaptado de (Cataneo *et al*; 2008)

Subprodutos	Solução Extratora	Técnicas de Identificação	Compostos ou grupo de compostos identificados	Teores
Bagaço COUDERC13 (branco)	Acetona a 80%	<ul style="list-style-type: none"> Folin-Ciocalteu Flavonóides (DMACA) DPPH ABTS VCEAC 	<ul style="list-style-type: none"> Compostos fenólicos totais Flavonóides totais Antioxidantes totais 	Compostos fenólicos totais ➤ 109.64 - 207.80 GAE mg/100g Flavonóides totais ➤ 53.88 e 106.22 mg/100g Capacidade antioxidante: ➤ 42.69 e 98.92 µmol/g
Bagaço PINOT GRIS (TINTO)				Compostos fenólicos totais ➤ 370.17 - 420.61 mg GAE/100g Flavonóides totais ➤ 271.32 - 346.21 mg/100g Capacidade antioxidante: ➤ 347.88 e 463.46 µmol/g

Notas: Método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, resultados expressos em GAEmg/100g; método ABTS, resultados expressos em mg/100g TEAC (atividade antioxidante equivalente ao trolox); VCEAC (atividade antioxidante equivalente à vitamina C); método DPPH (2,2-difenil- 1-picrilhidrazilo), método DMACA (p-dimetilaminocinmaldeído)

Tabela 1.4: Teores de capacidade antioxidante total obtidos em diferentes tipos de uvas. Adaptado de (Fu *et al*; 2011)

Produto	Método	Teores
Uva verde	FRAP	4.95±0.08 FRAP ($\mu\text{molFe(II)/g}$)
	TEAC	1.27±0.03 TEAC ($\mu\text{molTrolox/g}$)
	Fenólicos totais	23.20±1.58 (mg GAE/100g)
Uva vermelha	FRAP	6.70±0.13 FRAP ($\mu\text{molFe(II)/g}$)
	TEAC	3.04 ± 0.23 TEAC ($\mu\text{molTrolox/g}$)
	Fenólicos totais	60.35 ± 3.68 (mg GAE/100g)
Uva de mesa	FRAP	6.74 ± 0.32 FRAP ($\mu\text{molFe(II)/g}$)
	TEAC	3.95±0.11 TEAC ($\mu\text{molTrolox/g}$)
	Fenólicos totais	80.28±4.32 (mg GAE/100g)

Notas: FRAP—capacidade antioxidante do trolox equivalente; TEAC - poder antioxidante do ferro reduzido.

Tabela 1.5: Condições experimentais para a extração de antioxidantes do sumo de uva. Adaptado de (Vedana *et al*; 2008)

Produto	Solução extratora	Fatores que afetam a extração	Conclusões	Métodos
Sumo de uva	<p>Água, etanol, éter e metanol</p> <p>Extração supercrítica com CO₂</p>	<p>- O tempo</p> <p>-A temperatura</p>	<p>-Extratos aquosos: o rendimento da extração de polifenóis diminui com o tempo;</p> <p>- Extratos metanólicos e etanólicos: o rendimento da extração de polifenóis aumenta com o tempo;</p> <p>- O aquecimento das sementes de uva, favorece a liberação de compostos fenólicos o que aumentou a quantidade de compostos ativos nos extratos.</p>	<p>-Folin-Ciocalteu.</p> <p>-DPPH.</p> <p>-ABTS.</p>

2. Materiais e métodos

2.1. Reagentes e Soluções

Os padrões de ácido gálico, (-)epicatequina, e o trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, um análogo solúvel da vitamina E) foram adquiridos à empresa Sigma.

O reagente de Folin-Ciocalteu e o radical DPPH foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich. Todos estes reagentes eram de qualidade *p.a.* (95 - 99% de pureza). Outros compostos químicos de qualidade *p.a.*, como carbonato de sódio, nitrito de sódio, cloreto de alumínio, hidróxido de sódio, etanol, acetato de sódio, ácido acético, ácido fosfórico, fostato de sódio, cloreto de ferro (III), hexacianoferrato (III) de potássio, e o ácido tricloroacético foram adquiridos à empresa Merck.

Todos os solventes utilizados no processo de extração foram de grau HPLC. As soluções padrão de antioxidantes foram preparadas diariamente e armazenadas no escuro a 4°C. A água utilizada foi ultrapura (18,2MΩ/cm) e obtida a partir de um sistema Millipore.

2.2. Equipamentos e Materiais

Para a realização deste trabalho foi usado material de vidro classe A ou equivalente. Foram usados: balões volumétricos, de 10 mL, 25 mL, 50 mL e 100 mL, gobelés, tubos de ensaio, tubos falcon, matrizes, provetas, funis, sistema de destilação com refluxo, frascos de vidro escuro, micropipetas, células de plástico e esguicho.

Para triturar as amostras, utilizou-se uma trituradora Moulinex (moulinette) e uma trituradora industrial da marca Fritsch. As amostras foram pesadas numa balança analítica (Kern EW 220 3NM). As extrações foram efetuadas num banho termostaticado (ShakerBath SBS30), e centrifugadas, numa centrifuga Sartorius. Para as medições espectrofotométricas foi usado um espectrofotómetro Shimadzu 160-A.

2.3. Procedimentos

2.3.1 Extração

Para efetuar a etapa de extração, primeiramente triturou-se os subprodutos da vinha (folhas, bagaço e grainha), numa picadora Moulinex, sendo que o engaço e os caules foram triturados num triturador industrial (Fritsch). Após serem triturados foram guardados e congelados. Para se proceder às extrações dos compostos antioxidantes, os subprodutos foram descongelados e pesados para um erlenmeyer, numa quantidade rigorosa de cerca

de 1,5 g. De seguida adicionou-se água e etanol nas proporções mencionadas na Tabela 2.1 e Tabela 2.2, sendo o volume final de 50,0mL.

Tabela 2.1: Volume de etanol e água usado na extração dos compostos antioxidantes das folhas e caules.

Água (mL)	Etanol (mL)
50	0
40	10
25	25
10	40
0	50

Tabela 2.2: Volume de etanol e água usado na extração dos compostos antioxidantes do bagaço, engaço e grainha.

Água (mL)	Etanol (mL)
0	50
25	25
50	0

O tempo de extração utilizado foi de 5, 15, 30 e 60 minutos, para o engaço, bagaço e grainha e de 30 e 60 minutos para as folhas e os caules, usando-se as temperaturas de extração de 25°C, 40°C, 55°C e 100°C.

Após a etapa de extração, os extratos foram filtrados e guardados em várias alíquotas em frascos de vidro escuro e congelados. Posteriormente, procedeu-se à determinação do teor dos compostos fenólicos e flavonoides totais, do poder redutor e da atividade anti-radicalar com o radical DPPH.

2.4. Método de Folin-Ciocalteu (Fenóis totais)

O reagente de Folin-Ciocalteu foi preparado usando um fator de diluição de dez vezes, sendo esta solução preparada diariamente e abrigada da luz. Preparou-se também a solução de Na₂CO₃ a 7%, ou seja pesou-se 3,5 g de Na₂CO₃ e diluiu-se num balão de 50 mL. Em cada tubo de ensaio adicionou-se 500 µL amostra/ padrão e 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu, sendo posteriormente agitado durante 30 s no vortex. De seguida adicionou-se 2 mL de solução de Na₂CO₃ (7%) e agitou-se novamente no vortex. Por último colocou-se a incubar, num banho termostaticado, durante 15 minutos a 50°C. Deixou-se arrefecer e

fizeram-se as leituras da absorvância no comprimento de onda de 760 nm, tendo-se usado como antioxidante padrão o ácido gálico.

2.5. Flavonóides Totais

O teor dos flavonoides totais, presentes nos extratos foi determinado por um método espetofotométrico. O extrato ou antioxidante padrão (500 μ L) foi misturado com 2 mL de H₂O. De seguida adicionou-se 150 μ L de NaNO₂ (5%) e após 5 minutos adicionou-se 150 μ L de AlCl₃ (10%). Passado 1 minuto adicionou-se 1 mL de NaHO (1 mol L⁻¹). A absorvância das amostras foi determinada no comprimento de onda de 510 nm, usando como antioxidante padrão a epicatequina.

2.6. DPPH

A determinação da atividade anti-radicalar usando-se o DPPH foi efetuada com base no método descrito por Hatano (Hatano, 1988). Para tal preparou-se a solução de radical DPPH[•], ou seja, pesou-se 3,66 mg de DPPH num balão de 50,0 mL e diluiu-se em 33,5 mL de etanol e 16 mL de acetato de sódio (0,1 mol L⁻¹). Para preparar a solução de trolox (antioxidante padrão usado neste método) pesou-se 2,5 mg de trolox num balão volumétrico de 5 mL, perfazendo-se o volume com etanol. Ambas as soluções foram preparadas diariamente e resguardadas da luz.

Numa cuvete de plástico, de 3 mL, colocaram-se 65 μ L de antioxidante padrão (trolox) ou de amostras e 900 μ L de solução radicalar de DPPH[•]. As soluções foram guardadas no escuro durante 20 min tendo-se medido a absorvância a 525 nm.

2.7. Poder redutor

O poder redutor foi determinado de acordo com o método descrito por Oyaizu (OYAIZU., 1986). Em cada tubo falcon colocaram-se 500 μ L de amostra, 1,25 mL de tampão fosfato (pH 7,0) e 1,25 mL de K₃Fe(CN)₆ (1%), de seguida manteve-se a solução 20 min em banho termostatizado a 50 °C. Posteriormente adicionaram-se 1,25 mL de ácido tricloroacético (10%). Esta solução foi centrifugada a 2542 rpm durante 10 min.

Retiraram-se 1,25 mL de sobrenadante para outro tubo falcon e adicionou-se 1,25 mL de água e 1,25 mL de FeCl₃ (0,1%). A absorvância das amostras foi lida a 700 nm, usando-se como antioxidante padrão o ácido gálico.

Todas as leituras relativas aos métodos espetrofotométricos foram realizadas em duplicado.

3. Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo deste trabalho, tendo como finalidade responder aos objetivos pré-definidos.

Os métodos óticos usados para a determinação da capacidade antioxidante total dos extratos já se encontravam validados pelo grupo de investigação (GRAQ) onde decorreu o trabalho experimental, no que diz respeito à zona de linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão. Por isso só foi necessário traçar as curvas de calibração, no início de cada análise, de modo a confirmar a validade da zona linear. No caso do método espectrofotométrico em que se utiliza o radical DPPH^{*}, a curva de calibração tem de ser traçada diariamente.

As curvas de calibração utilizadas são as apresentadas na Tabela 3.1, sendo que a de DPPH é apenas uma das muitas utilizadas.

Tabela 3.1: Curvas de calibração para os quatro métodos utilizados.

Determinação	Curvas de calibração
Fenóis totais	Absorvância= $9,85 \times 10^{-3}$ [GAE] - $3,04 \times 10^{-2}$
Flavonoides totais	Absorvância= $3,61 \times 10^{-3}$ [epicatequina] + $4,09 \times 10^{-2}$
Poder redutor	Absorvância= 0,011 [GAE] + 0,017
Atividade anti-radicalar (DPPH)	Absorvância= -0,077 [trolox] + 1,768

Numa fase inicial, os estudos experimentais incidiram sobre os sub-produtos da videira, as folhas e os caules, tendo-se estudado a influência de várias variáveis, no processo de extração dos compostos antioxidantes dos referidos sub-produtos, tais como o tempo (30 min e 60 min), a temperatura (25°C, 40°C, 55°C e 100°C) e a razão de volume de solvente água/etanol (100/0, 20/80, 80/20, 50/50 e 0/100). Posteriormente os estudos incidiram sobre os sub-produtos do vinho, tais como, o bagaço, o engaço e a grainha, onde as variáveis foram as mencionadas anteriormente, mas para tempos (5 min, 15 min, 30 min e 60 min) e razões de solvente água/etanol (0/100, 50/50 e 100/0) diferentes.

3.1. Capacidade antioxidante total de folhas de videira

Tal como foi referido anteriormente, os extratos obtidos a partir de folhas de videira foram avaliados relativamente ao seu teor em compostos antioxidantes. Dos vários parâmetros analíticos usados na etapa de extração, primeiramente avaliou-se a razão de

solvente (água/ etanol) tendo-se fixado uma temperatura de 25°C e um tempo de extração de 30 min.

A Figura 3.1, ilustra os teores de fenóis e flavonoides totais, poder redutor e atividade anti-radicalar DPPH, a uma temperatura de 25°C e um tempo de extração de 30 min.

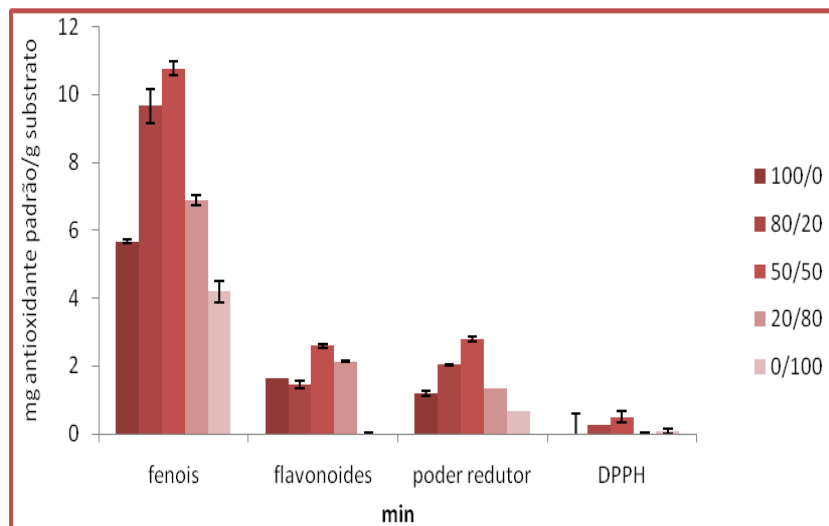


Figura 3.1: Capacidade antioxidante das folhas obtida variando a razão água/etanol para 30 min a 25°C.

De todas as razões de solvente extrator (água/etanol) utilizadas, a que confere maiores quantidades de compostos antioxidantes é a razão 50/50% (V/V). Conforme se pode visualizar na Figura 3.1, os valores obtidos em fenóis e flavonoides totais, poder redutor e atividade anti-radicalar são maiores quando se utiliza esta razão de extração. Este facto deverá estar relacionado com a capacidade de esta mistura (água /etanol) conseguir extrair maior quantidade de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis.

Para as outras temperaturas estudadas (40°C e 55°C) verificou-se o mesmo, ou seja, maior capacidade antioxidante para uma razão extratora de 50/50% (V/V). A exceção ocorre para a temperatura de 100°C, onde a razão de solvente foi sempre de 100/0 (água/etanol), uma vez que o ponto de ebulição do etanol é inferior a 100°C.

Considerando que a razão de solvente ideal para a extração é de 50/50, este valor foi fixado para se estudar a influência da temperatura e do tempo de extração no teor de compostos antioxidantes existentes nos subprodutos.

Na Figura 3.2 encontram-se os resultados analíticos obtidos para os diferentes métodos óticos utilizados (teor de fenólicos e flavonoides totais, poder redutor e atividade anti-radicalar), para os tempos de extração de 30 e 60 min, e para as temperaturas de 25°C, 40°C, 55°C e 100°C).

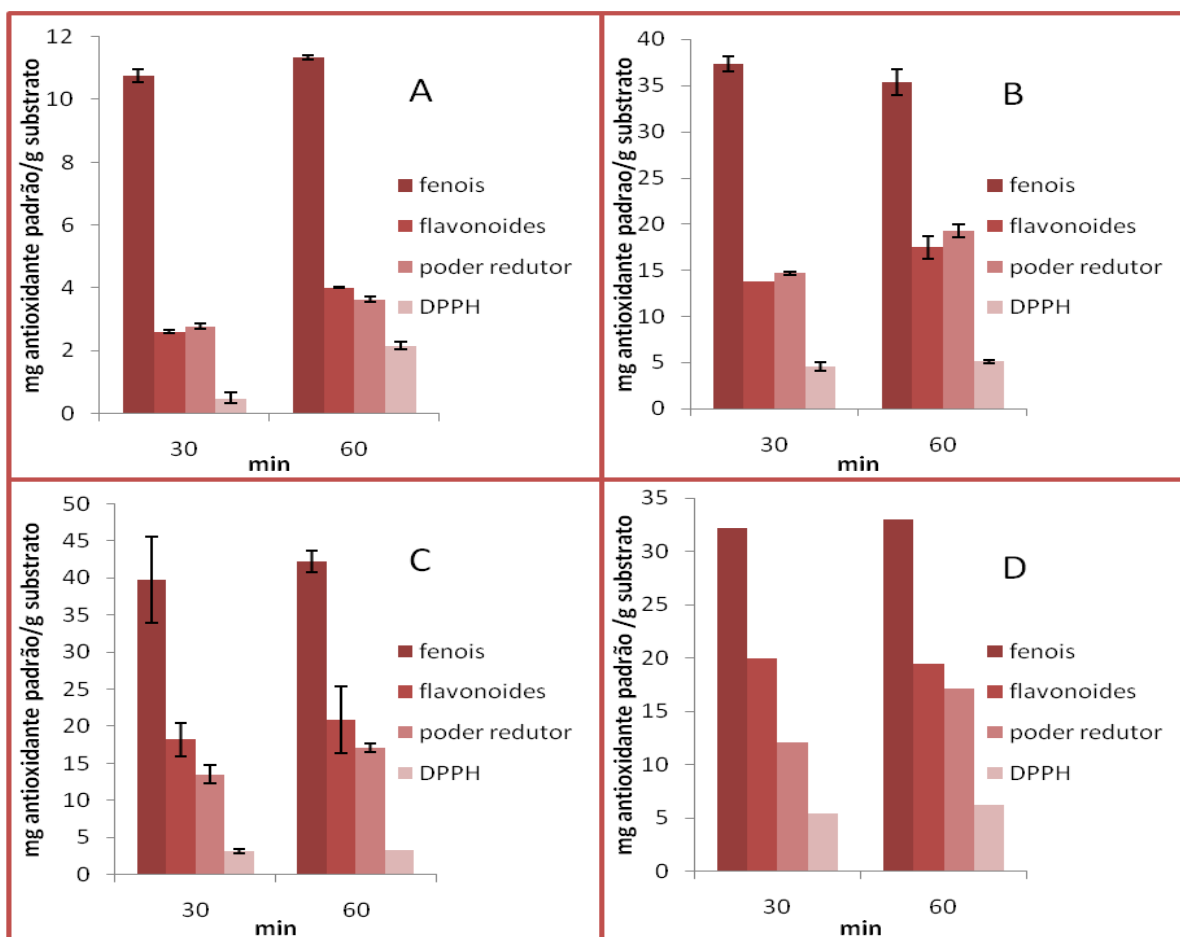


Figura 3.2: Capacidade antioxidante total dos extratos das folhas obtida pelos diferentes métodos óticos em função do tempo (30 e 60 min) e para as temperaturas de 25°C (A), 40°C (B), 55°C (C) e 100°C (D).

A Figura 3.2 A diz respeito aos teores de compostos antioxidantes obtidos à temperatura de 25°C e com uma razão de solvente de 50/50% (V/V). A atividade anti-radicalar DPPH é o único método em que os valores obtidos são significativamente maiores com o aumento do tempo de extração. Conforme se pode verificar, a esta temperatura (25°C), o tempo de extração praticamente não tem influência na quantidade de compostos antioxidantes extraídos (com exceção do DPPH).

Relativamente às Figura 3.2 B, C e D, que são referentes às temperaturas de 40°C, 55°C, e 100°C, respetivamente, observa-se que o aumento do tempo de extração (de 30 min para 60 min) não provoca alterações significativas nos teores de fenóis totais, flavonoides totais, poder redutor e atividade anti-radicalar. Assim sendo, e de modo a fazer uma economia do ponto de vista do consumo de energia e do tempo de análise, considerou-se que 30 min seria o melhor tempo de extração.

A Figura 3.3 ilustra a influência da temperatura de extração na capacidade antioxidante total obtida nos extratos de folhas de videira.

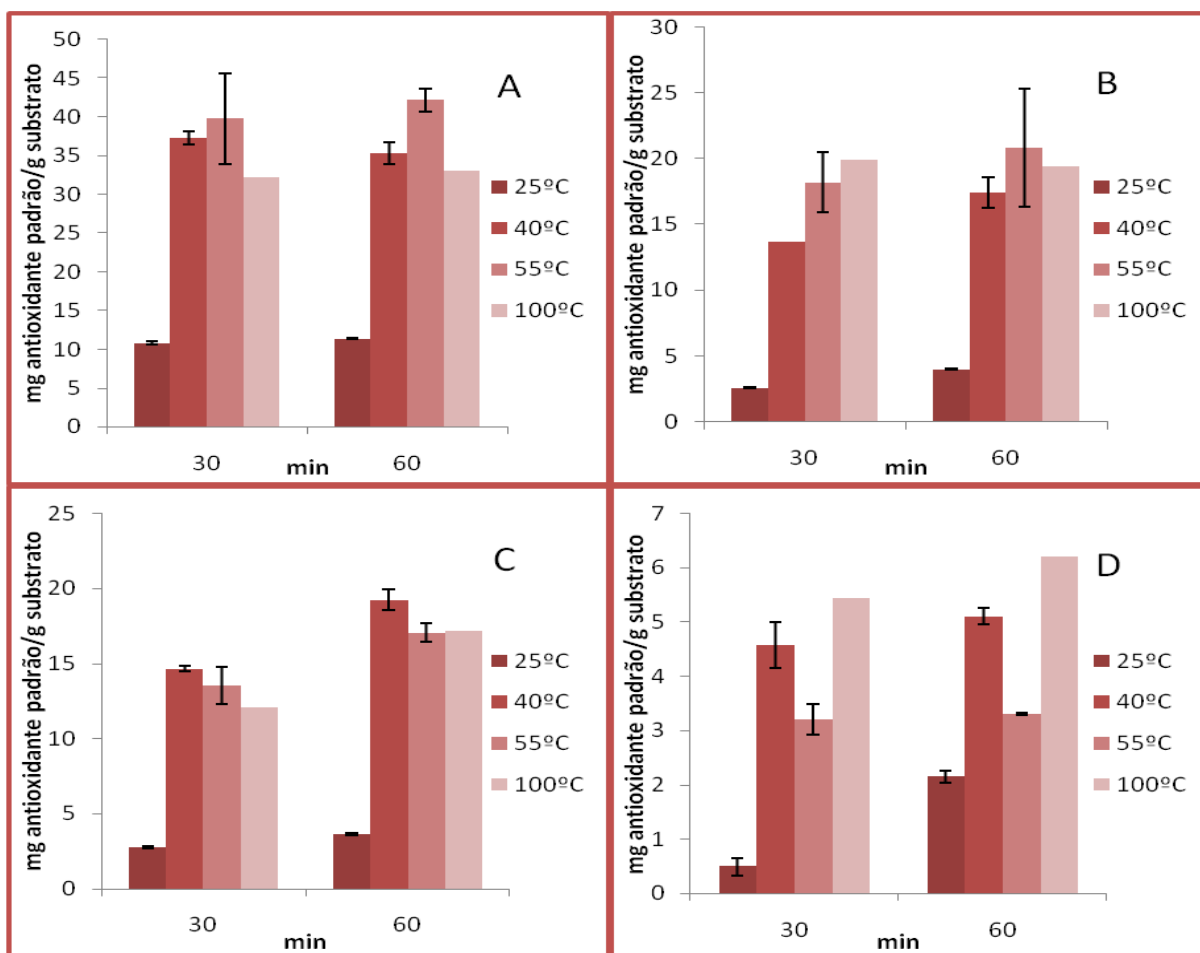


Figura 3.3: Capacidade antioxidante total dos extratos das folhas de videira. (A) - Fenóis totais; (B) - Flavonóides totais; (C) - Poder redutor; (D) – Atividade anti-radicalar DPPH.

A Figura 3.3 A representa os teores de fenóis totais obtidos, podendo-se verificar, que para a temperatura de 55°C se atinge o teor máximo de compostos fenólicos extraídos das folhas da videira. No entanto, e atendendo aos gastos associados do ponto de vista de energia, compensaria utilizar uma temperatura de 40°C, uma vez que os teores de compostos fenólicos obtidos a 40°C são próximos dos obtidos a 55°C. Neste caso, uma diferença de 15°C na temperatura de extração acarreta menores custos energéticos.

A Figura 3.3 B é referente aos teores de flavonoides totais. Neste caso, verifica-se que quanto maior é a temperatura de extração maior é o teor de compostos flavonoides extraídos.

O poder redutor apresenta maiores valores de capacidade antioxidante total quando se utilizou a temperatura de extração de 40°C (Figura 3.3 C).

Por sua vez, a atividade anti-radicalar DPPH revela que a 100°C se obtêm maiores valores analíticos, o que de ponto de vista energético e económico acarreta custos mais elevados. Tendo em conta os teores globais obtidos, sugere-se efetuar as extrações a 40°C durante 30 min.

3.2. Capacidade antioxidante total de caules de videira

Tal como no estudo efetuado com as folhas, também se começou por estudar o efeito da razão de solventes, no processo de extração dos compostos antioxidantes existentes nas amostras de caule da videira.

A Figura 3.4 ilustra os teores de fenóis, flavonoides, poder redutor e atividade anti-radicalar com DPPH, a uma temperatura de 25°C e para um tempo de extração de 30 min.

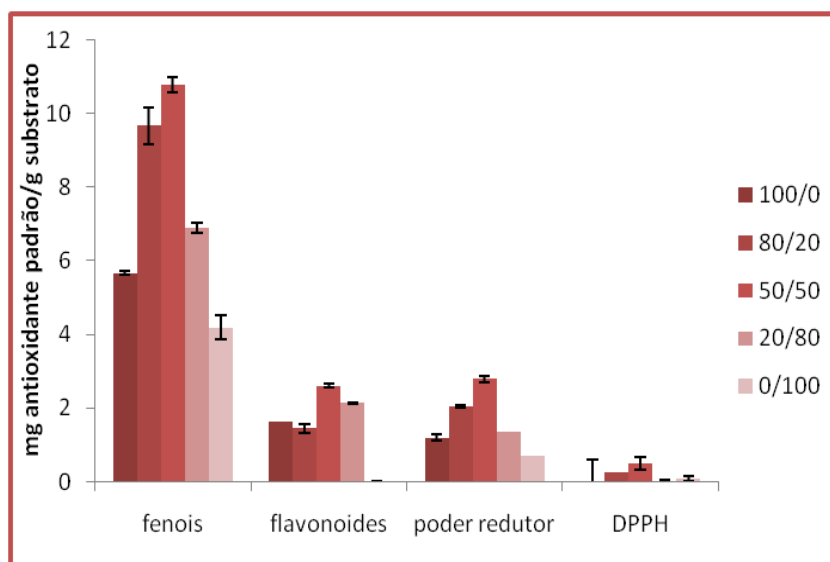


Figura 3.4: Capacidade antioxidante total dos caules obtida variando a razão de solventes extratores (água/etanol) para 30 min a 25°C.

A Figura 3.4 mostra que a razão água/etanol de 50/50 (V/V) é a que permite obter maiores teores em compostos antioxidantes, para todos os métodos analisados, tal como se observou no estudo anterior realizado com as folhas de videira. Assim, esta razão foi fixada para estudar o efeito dos outros parâmetros no processo extrativo, com exceção da temperatura de 100°C para a qual a razão água/etanol utilizada foi de 100/0 (V/V), visto o etanol apresentar um ponto de ebulição inferior a 100°C.

Encontram-se ilustrados na Figura 3.5 os resultados analíticos obtidos para os diversos métodos óticos utilizados, para os tempos de extração de 30 e 60 min e diferentes temperaturas (25°C, 40°C, 55°C e 100°C).

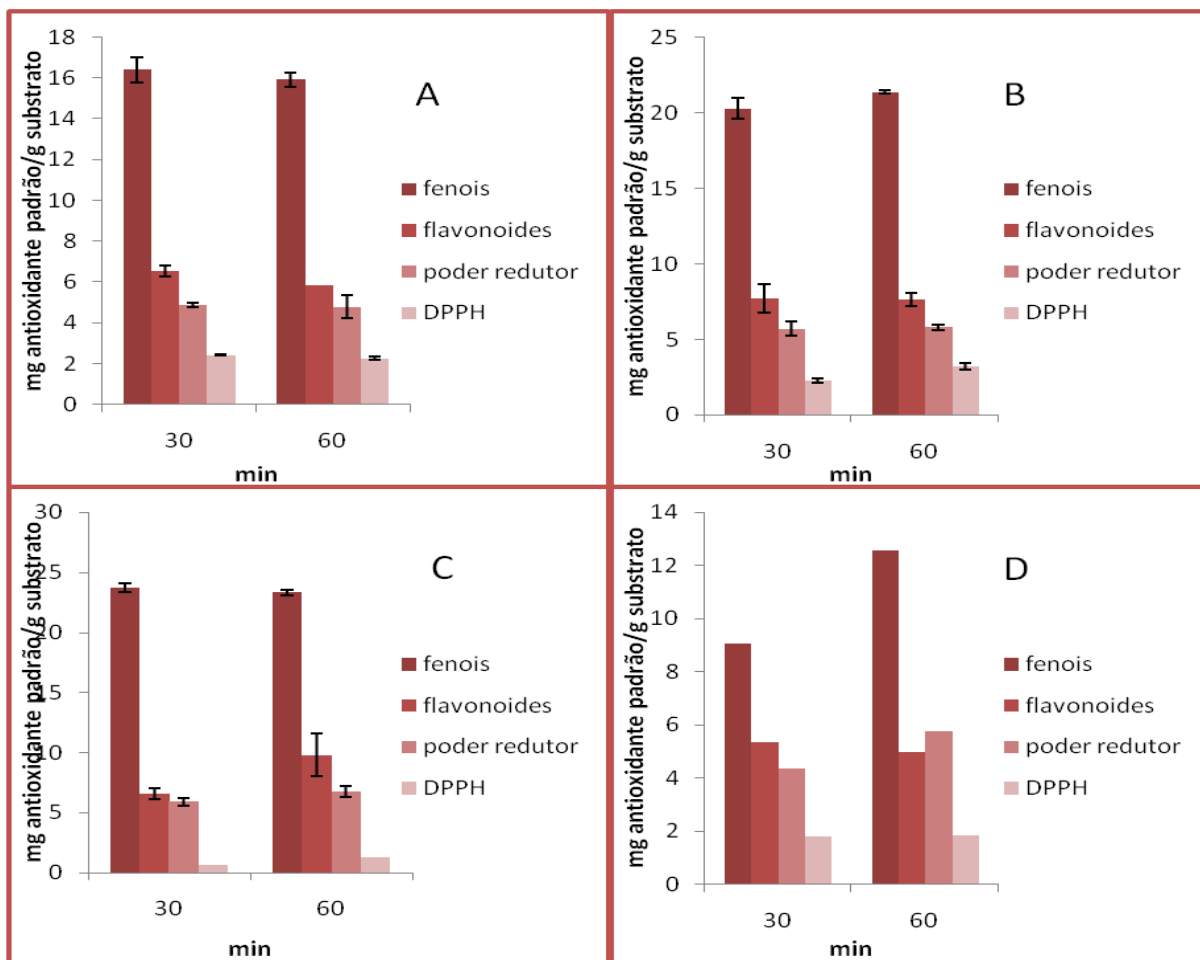


Figura 3.5: Capacidade antioxidante total dos extratos de caules obtida pelos diferentes métodos óticos em função do tempo (30 e 60 min) e para as temperaturas de 25°C (A), 40°C (B), 55°C (C) e 100°C (D).

A Figura 3.5 é composta por quatro imagens (A, B, C e D) que dizem respeito às temperaturas de extração de 25°C, 40°C, 55°C e 100°C, respetivamente.

Na Figura 3.5 A (25°C), observa-se que o aumento do tempo de extração não proporciona aumentos nos teores dos compostos extraídos, sendo que quando se utiliza um tempo de extração de 30 min, se obtêm teores ligeiramente superiores.

Relativamente às Figuras 3.5 B (40°C), C (55°C) e D (100°C), observa-se que o aumento do tempo de extração provoca ligeiros aumentos nos teores de compostos fenólicos, flavonoides, poder redutor e atividade anti-radicalar obtidos. No entanto, e face aos custos económicos associados ao processo extrativo, verifica-se que não compensa usar tempos de extração superiores a 30 min.

A Figura 3.6 ilustra a influência da temperatura de extração na capacidade antioxidante total dos extratos dos caules de videira.

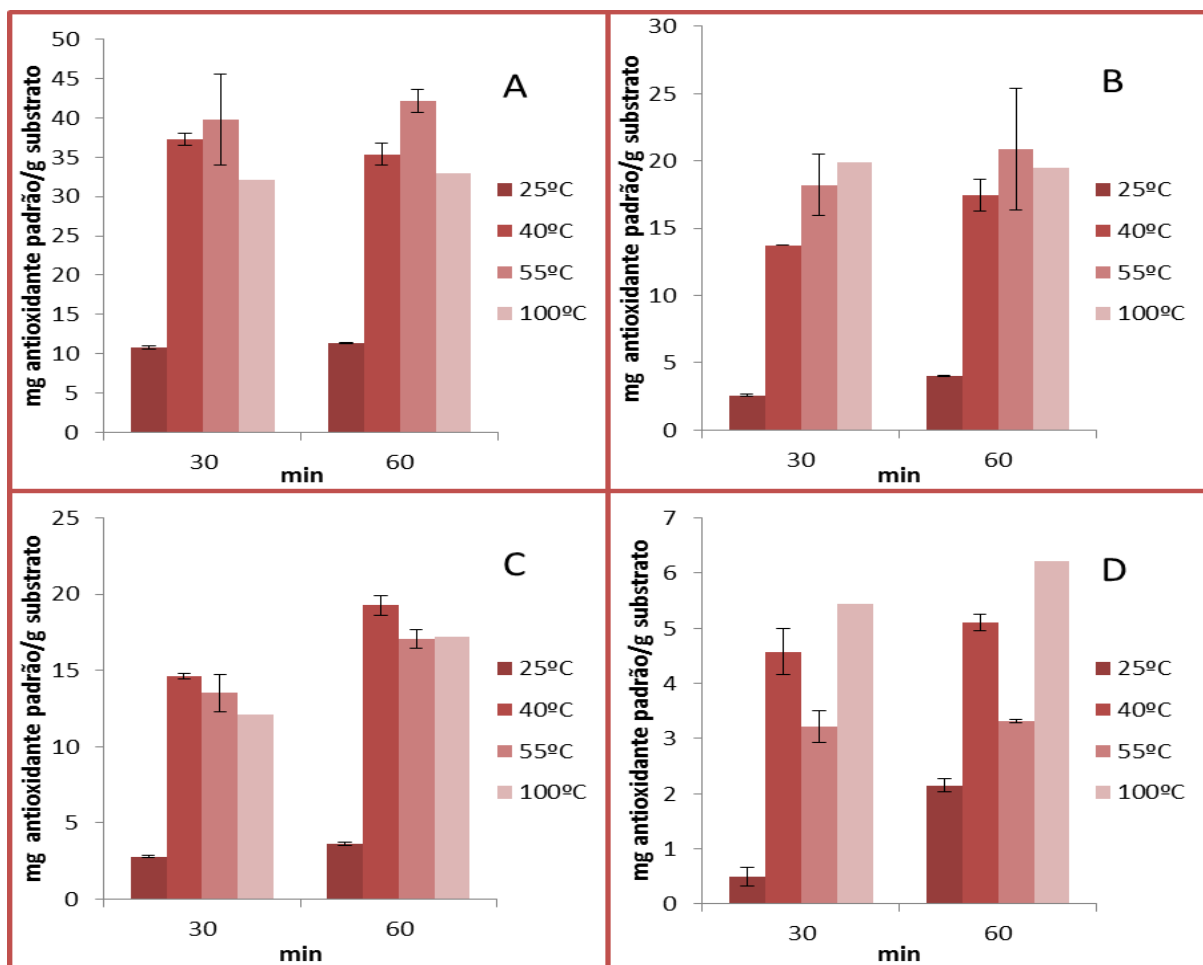


Figura 3.6: Capacidade antioxidante total dos extratos dos caules de videira. (A) - Fenóis totais; (B) - Flavonóides totais; (C) - Poder redutor; (D) - atividade anti-radicalar DPPH

A Figura 3.6 A é referente aos teores de fenóis totais analisados nos extratos dos caules de videira. Verifica-se que os teores de compostos fenólicos são superiores quando se utilizou uma temperatura de extração de 55°C e durante 30 min. No entanto, se compararmos os valores obtidos a 40°C e a 55°C, os valores são muito próximos, pelo que se poderá utilizar esta temperatura, como temperatura ideal para o processo extrativo.

Os teores de flavonoides totais encontram-se na Figura 3.6 B, observando-se que para o tempo de extração de 30 min e à temperatura de 100°C se obtêm os melhores resultados. Contudo quando se usou o tempo de extração de 60 min, os valores mais elevados foram obtidos à temperatura de 55°C.

O poder redutor apresentou melhores resultados analíticos à temperatura de 40°C e 60 min de extração (Figura 3.6 C).

A atividade anti-radicalar DPPH apresentou valores mais altos, quando se utilizou a temperatura de extração de 40°C e um tempo de extração de 60 min.

Verifica-se então que as condições ideais para a extração dos compostos com propriedades antioxidantes dos caules de videira, tendo em atenção as questões económicas e ambientais correspondem à utilização de uma temperatura de 40°C, utilizando uma mistura de extração com 50% de água e 50% de etanol, durante 30 min.

3.3. Capacidade antioxidante total de bagaço

Considerando que para os sub-produtos folhas e caules a razão ótima de solventes extratores foi sempre de 50/50 % (V/V), o planeamento para as extrações efetuadas para os sub-produtos bagaço, engaço e grainha, foi mudado tendo-se testado somente as razões de água/etanol 100/0, 50/50 e 0/100, conforme está descrito na secção 2.3. Para além disso, testaram-se mais dois tempo de extração, 5 e 15 min.

A Figura 3.7 ilustra os teores de fenóis totais, flavonoides totais, poder redutor e atividade anti-radicalar DPPH do bagaço, a uma temperatura de extração de 25°C e um tempo de extração de 30 min.

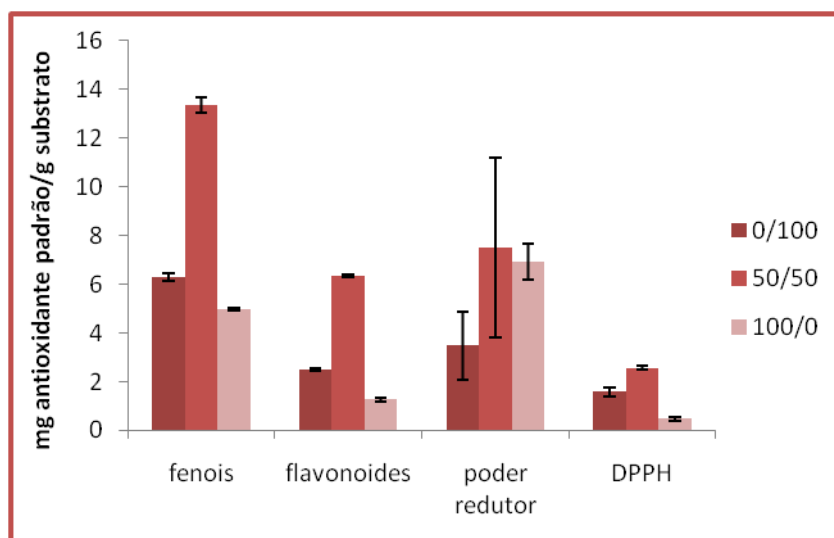


Figura 3.7: Capacidade antioxidante total do bagaço obtida variando a razão de solventes extratores (água/etanol) para 30 min a 25°C.

Para as razões de solventes extratores (água/etanol) estudadas, observa-se que mistura de solventes que consegue extrair maior quantidade de compostos antioxidantes é a razão 50/50 % (V/V). Este resultado já tinha sido obtido nos outros subprodutos estudados anteriormente. Assim, e como foi realizado nos casos anteriores, fixou-se esta razão de solventes extratores para se estudar os restantes fatores que influenciam as etapas de extração. Quando se utilizou a temperatura de 100°C a razão utilizada foi de 100% de água.

A Figura 3.8 apresenta os resultados analíticos obtidos para os diversos métodos óticos utilizados e para as várias temperaturas testadas.

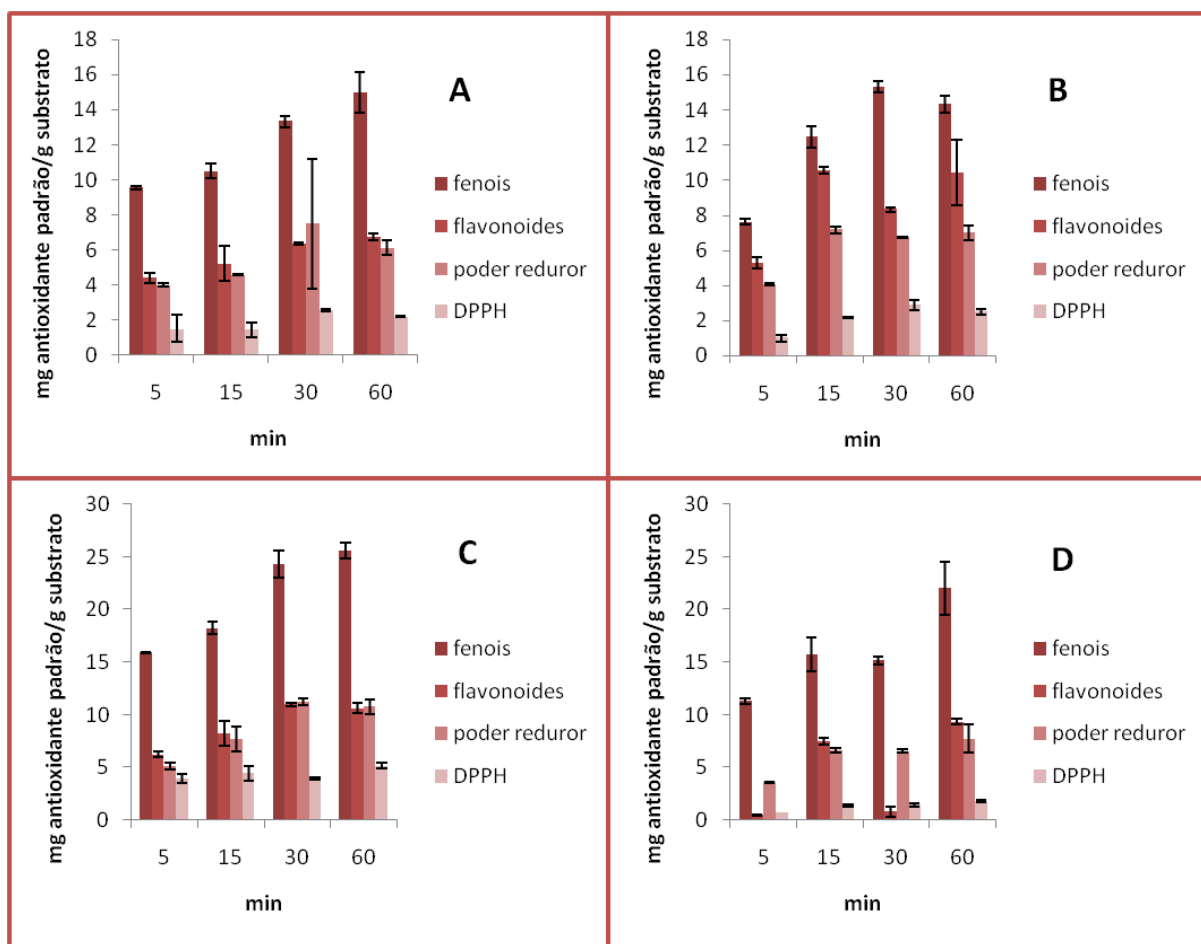


Figura 3.8: Capacidade antioxidante total dos extratos do bagaço obtida pelos diferentes métodos óticos em função do tempo (5, 15, 30 e 60 min), para 25°C (A), 40°C (B), 55°C (C) e 100°C (D).

A Figura 3.8 A, corresponde às extrações efetuadas ao sub-produto bagaço à temperatura de 25°C, a Figura 3.8 B à temperatura de 40°C, a Figura 3.8C à temperatura de 50°C e a Figura 3.8 D à temperatura de 100°C.

Analisando a Figura 3.8 na sua generalidade, os teores em compostos antioxidantes aumentam à medida que a temperatura de extração aumenta (para o mesmo tempo de extração) com exceção da temperatura de 100°C onde os resultados são mais variáveis. Relativamente ao fator tempo de extração, verifica-se que à medida que se aumenta o tempo de extração o teor de compostos antioxidantes extraídos aumenta. Assim sendo a temperatura que apresenta melhores resultados é a de 55°C.

A Figura 3.9 retrata a influência que a temperatura de extração tem nos teores de capacidade antioxidante total obtida a partir do bagaço.

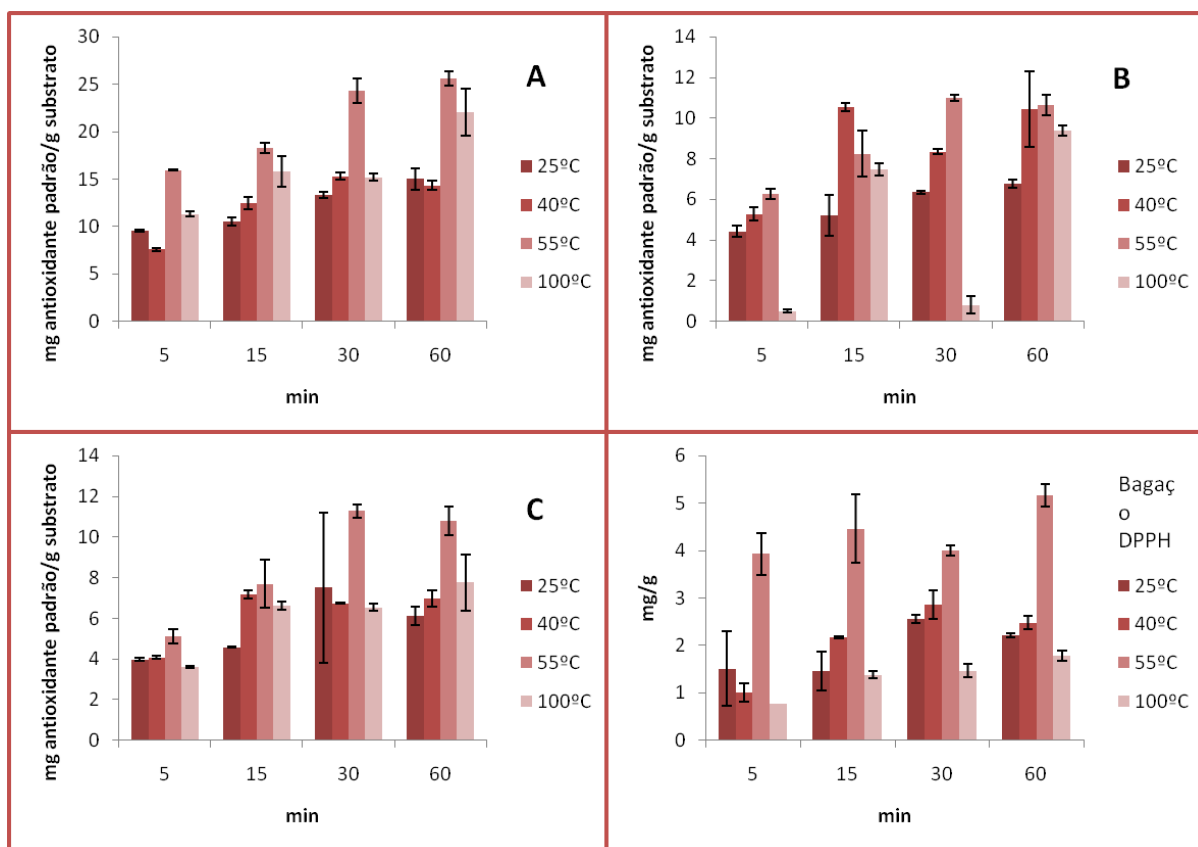


Figura 3.9: Capacidade antioxidante do bagaço obtida por cada método em função da temperatura. (A) - Fenóis totais; (B) - Flavonóides totais; (C) - Poder redutor; (D) - atividade anti-radicalar DPPH

A Figura 3.9 A representa os teores de fenóis totais obtidos nos extratos do bagaço, onde se pode verificar que os valores máximos de compostos fenólicos extraídos são obtidos à temperatura de 55°C, apresentando teores significativamente mais elevados do que os teores obtidos quando se utiliza uma temperatura de extração de 25°C e 40°C, justificando assim os custos energéticos envolvidos.

A Figura 3.9 B, ilustra os teores obtidos para os flavonoides totais, sendo o teor máximo atingido para a temperatura de 55°C para um tempo de extração de 30 min. Contudo, verifica-se que a 40°C e com 15 min de extração se obtêm valores muito semelhantes.

Os resultados obtidos para o poder redutor são evidenciados na Figura 3.9 C, sendo que é a 55°C e a 30 min que se obtêm os maiores teores de capacidade antioxidante.

Os teores da atividade anti-radicalar DPPH estão ilustrados na Figura 3.9 D, sendo os maiores teores obtidos a 55°C.

Considerando todos estes dados obtidos para os extratos do bagaço, propõe-se as condições de razão de água/etanol 50/50 (V/V), temperatura de 55°C e 30 min de tempo de extração.

3.4. Capacidade antioxidante do engaço

A Figura 3.10 ilustra os teores de fenóis e flavonoides totais, poder redutor e atividade anti-radicalar DPPH obtidos para extratos de engaço de videira à temperatura de 25°C e 30 min de extração.

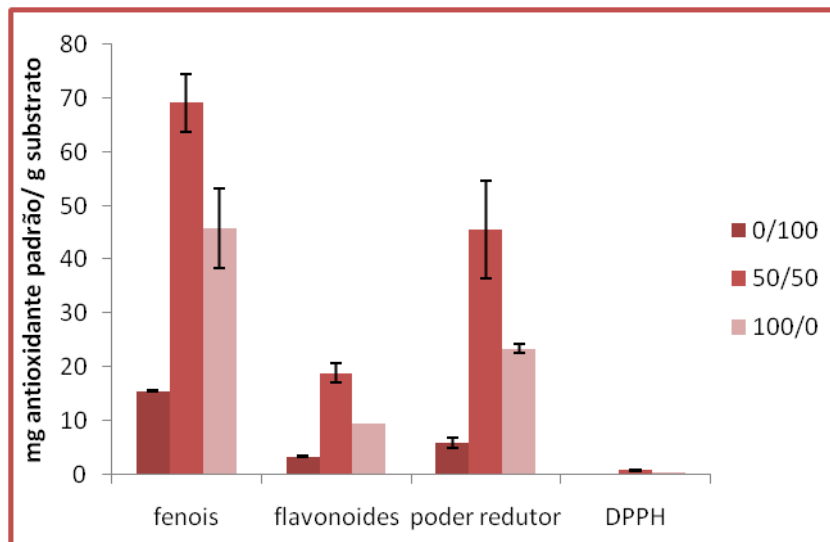


Figura 3.10: Capacidade antioxidante do engaço obtida variando a razão água/etanol para 30 min a 25°C.

Analisando as diversas razões de solventes extratores (água/etanol) estudadas (100/0, 0/100, 50/50), verifica-se que a razão de solventes que permite obter maiores quantidades de antioxidantes extraídos é a razão de solventes de 50/50 % (V/V), tal como aconteceu com os restantes subprodutos estudados. Deste modo, esta razão de solventes foi fixada para se conseguir avaliar os restantes fatores analíticos no processo extrativo. Para a temperatura de 100°C, a razão utilizada foi de 100/0 (água/etanol) pela mesma razão apresentada para os outros produtos.

A Figura 3.11 apresenta os teores de antioxidantes obtidos para os vários métodos analíticos utilizados.

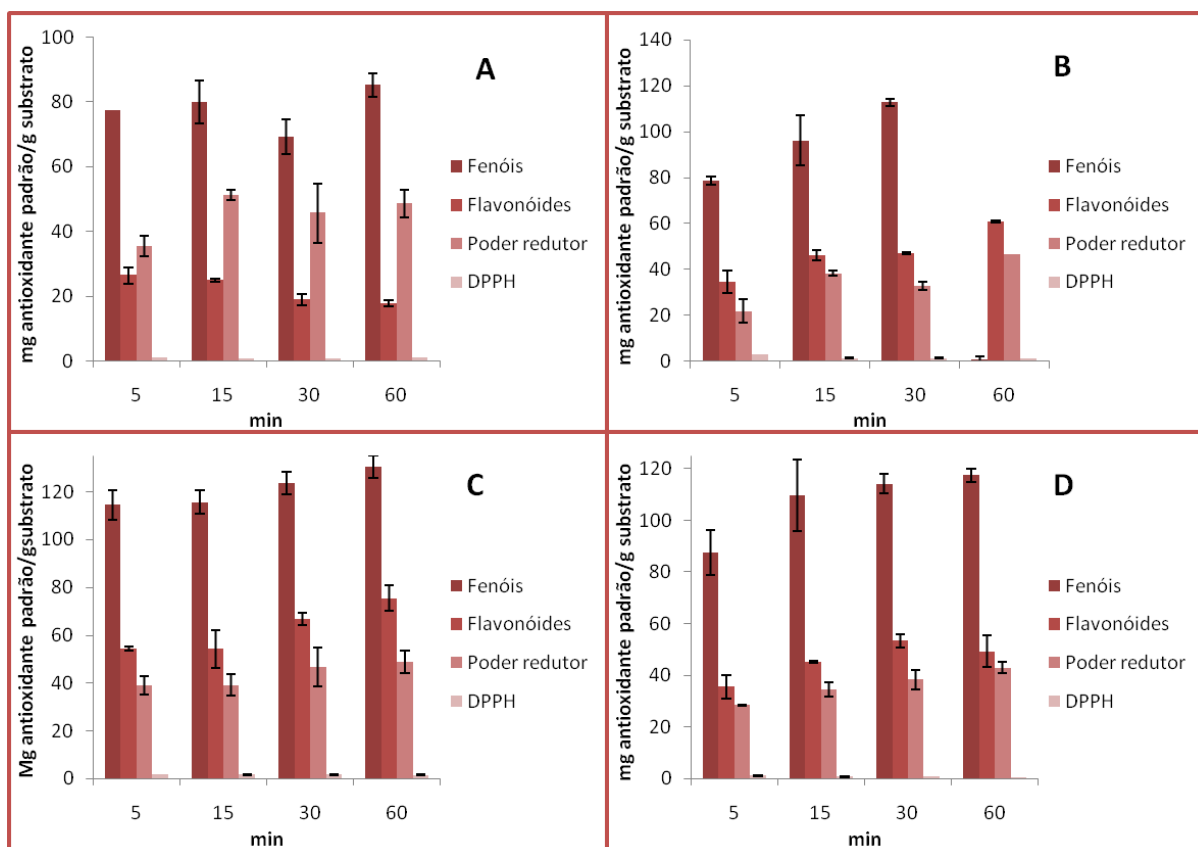


Figura 3.11: Capacidade antioxidante total dos extratos do engaço obtida pelos diferentes métodos óticos em função do tempo (5,15, 30 e 60 min) para 25 (A), 40 (B), 55 (C) e 100°C (D).

As Figura 3.11 A, B, C, e D correspondem às temperaturas de extração de 25°C, 40°C, 55°C e 100°C, respetivamente. Observa-se que os teores mais elevados de compostos antioxidantes extraídos são obtidos para a temperatura de 55°C e para o tempo de extração de 60 min. No entanto, as diferenças para os valores obtidos, a esta temperatura ao fim de qualquer tempo de extração utilizado não são muitos díspares dos valores obtidos ao fim de 60 minutos.

A Figura 3.12 demonstra a influência da temperatura de extração na capacidade antioxidante total obtida em extratos de engaço.

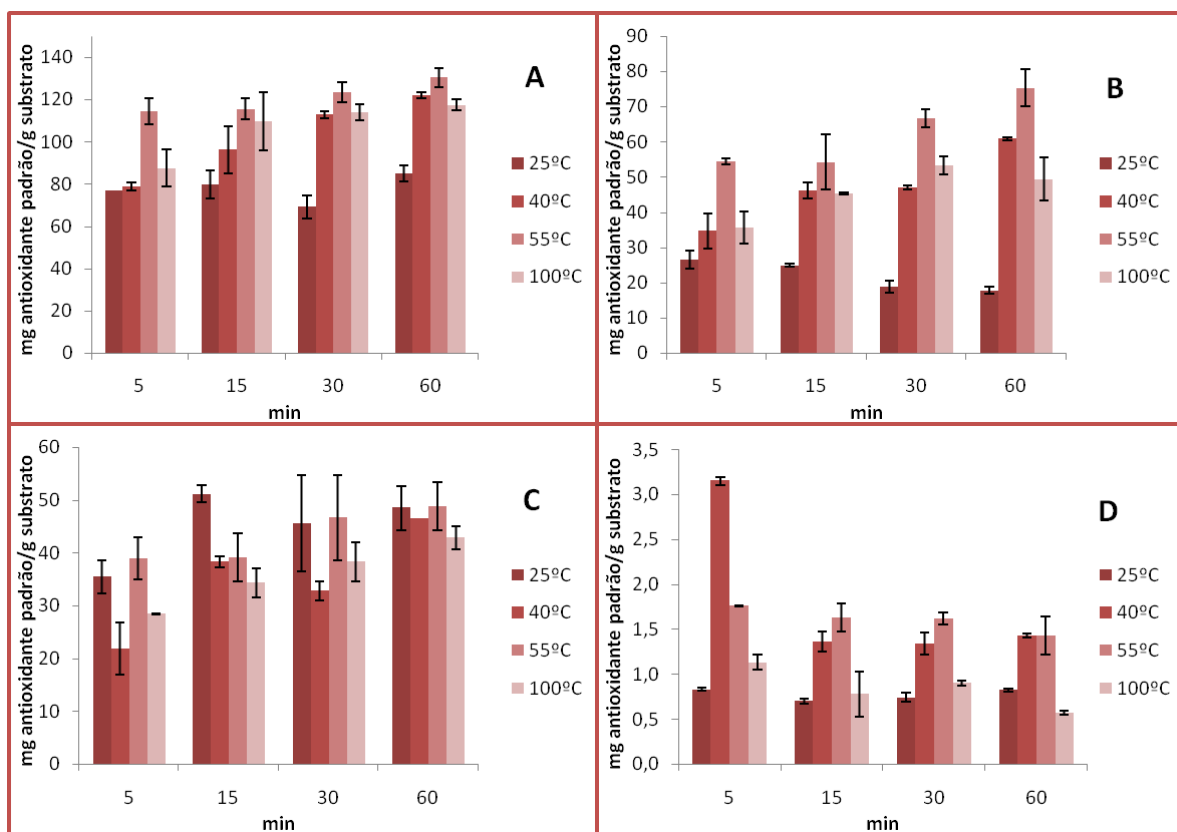


Figura 3.12: Capacidade antioxidante total do engaço. (A) - Fenóis totais; (B) - Flavonóides totais; (C) - Poder redutor; (D) - atividade anti-radicalar DPPH

Os teores de fenóis totais são ilustrados pela Figura 3.12 A, onde se pode verificar que para a temperatura de 55°C se obtêm os maiores teores em compostos fenólicos extraídos, não existindo grandes diferenças nos teores com o tempo de extração. O mesmo acontece para os flavonoides totais identificados pela Figura 3.12 B, mas neste caso o tempo de extração influencia a quantidade de compostos flavonoides extraída.

A Figura 3.12 C corresponde aos teores de capacidade antioxidante obtida pelo método do poder redutor, verificando-se para os valores determinados oscilações com a temperatura e tempo de extração.

Em relação à atividade anti-radicalar DPPH (Figura 3.12 D), verifica-se que à temperatura de 40°C e para 5 min de extração os valores são muito mais elevados do que nas outras condições experimentais. Assim, as condições ideais de extração para se obter maior quantidade de compostos antioxidante são uma temperatura de extração de 40°C e tempo de extração de 5 min.

3.5. Capacidade antioxidante da grainha

A Figura 3.13 ilustra os teores de fenóis e flavonoides totais, poder redutor e atividade anti-radicalar com o radical DPPH obtidos para extratos de grainha à temperatura de 25°C e 30 min de extração.

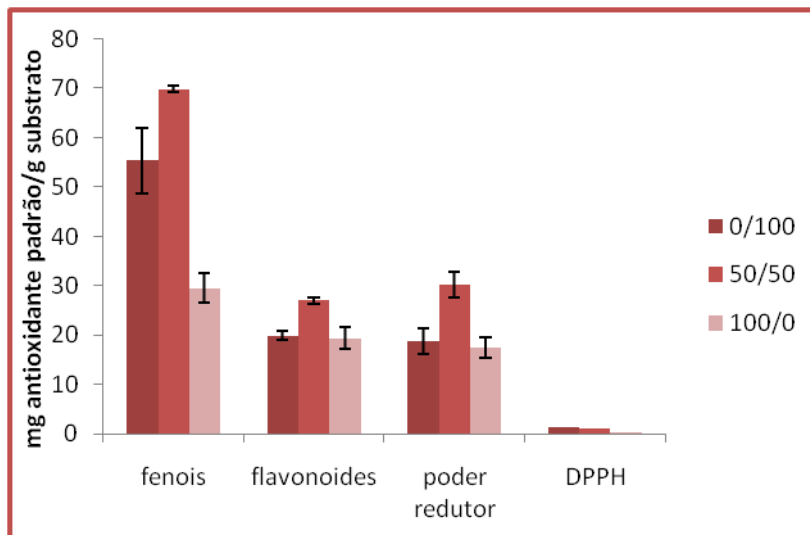


Figura 3.13: Capacidade antioxidante da grainha obtida variando a razão água/etanol para 30 min a 25°C.

Tal como nos casos anteriores, a razão de solventes 50/50 % (V/V) foi a que originou maiores teores em compostos antioxidantes. Assim, e como foi feito nos casos anteriores fixou-se esta razão de solventes para se avaliar o efeito dos outros parâmetros (temperatura e tempo) no processo de extração dos compostos com capacidade antioxidante.

A Figura 3.14 ilustra a influência da temperatura nos métodos analisados.

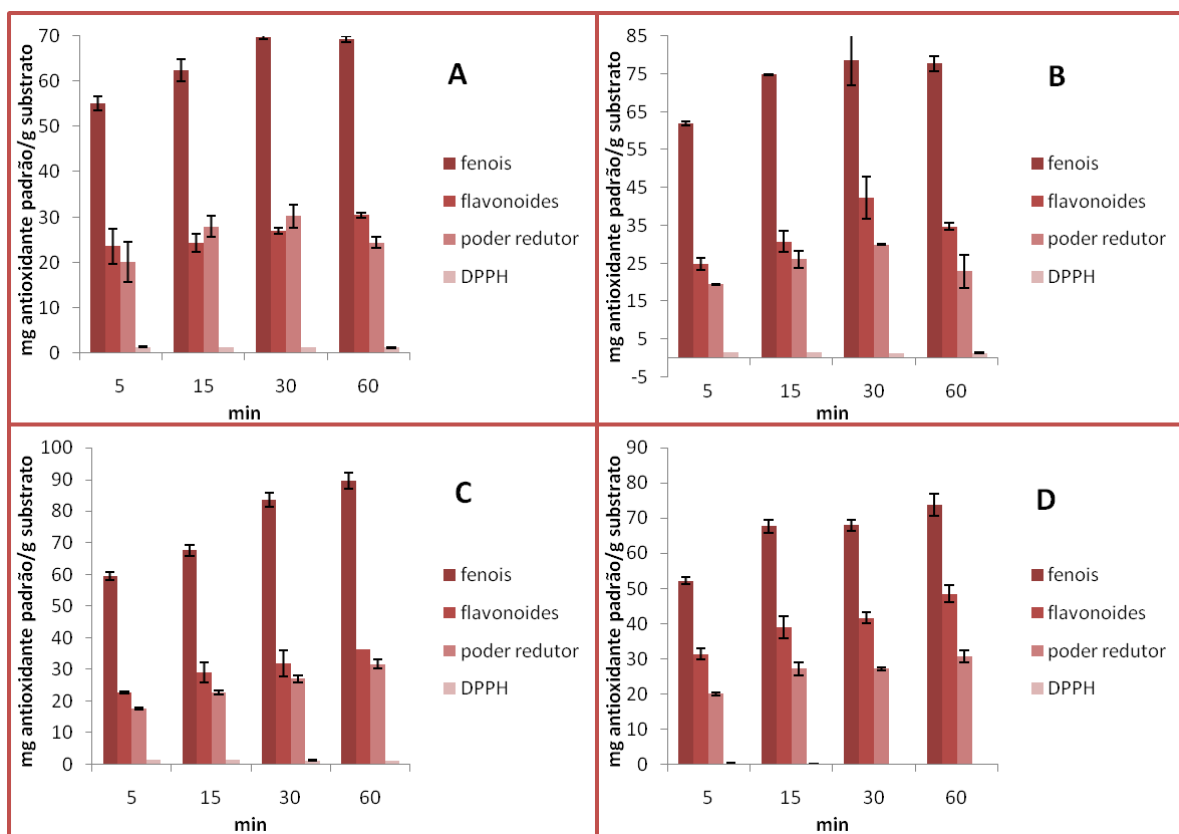


Figura 3.14: Capacidade antioxidante total dos extratos de grainha obtida pelos diferentes métodos óticos em função do tempo (5,15, 30 e 60 min) para 25 (A), 40 (B), 55 (C) e 100°C (D).

Das temperaturas estudadas, 25°C, 40°C, 55°C e 100°C, representadas na Figura 3.14 A, B, C e D, respetivamente, verifica-se que os teores mais elevados de compostos fenólicos obtidos são para a temperatura de 55°C e para um tempo de extração de 60 min. Para a obtenção de compostos flavonoides as condições ótimas de extração são de 100°C e 60 min. Por sua vez, o poder redutor tem um teor máximo a 55°C com 30 min de extração. A atividade anti-radicalar com o DPPH apresenta melhores resultados para a temperatura de 55°C e 5 min.

A Figura 3.15 demonstra a influência da temperatura de extração na capacidade antioxidante total da grainha.

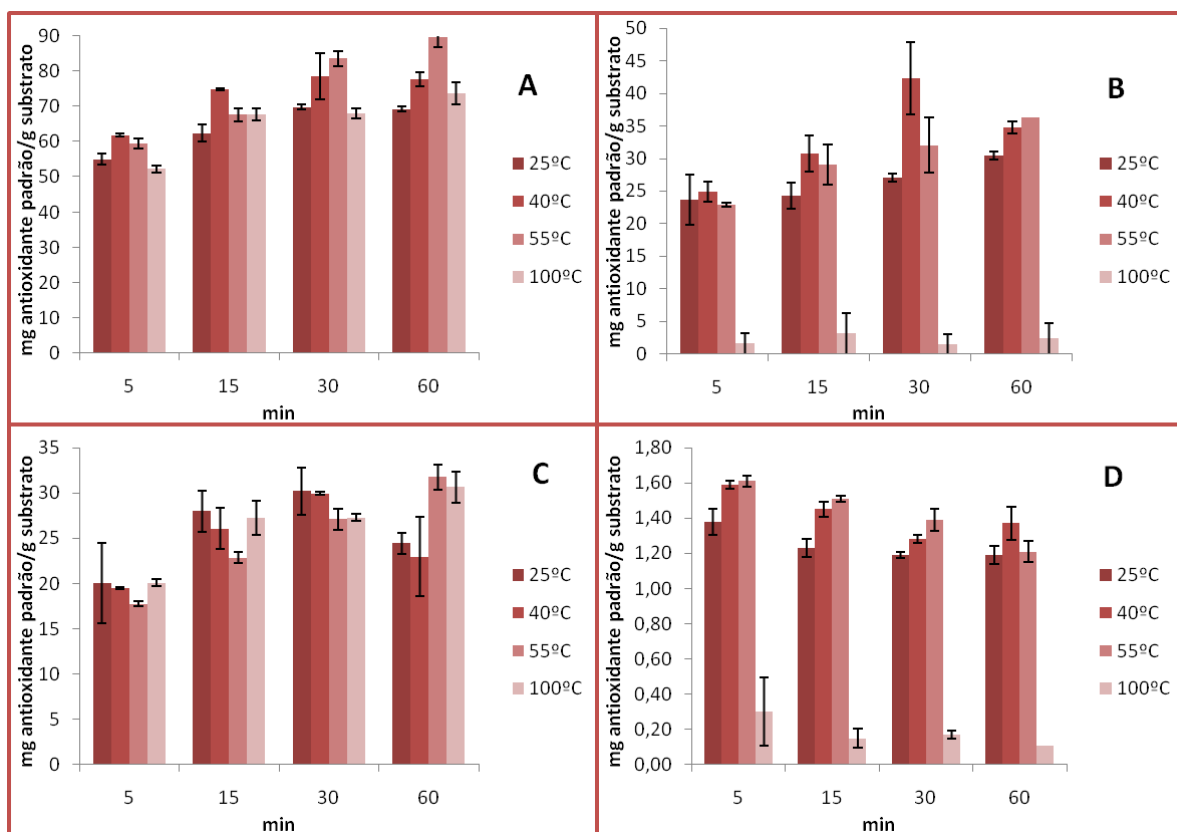


Figura 3.15: Capacidade antioxidante total da grainha (A) - Fenóis totais; (B) - Flavonóides totais; (C) - Poder redutor; (D) - atividade anti-radicalar DPPH

Os fenóis totais obtidos nos extratos da grainha estão ilustrados na Figura 3.15 A, onde se pode observar que os teores mais elevados são obtidos a 55°C e 60 min de extração. Se se considerar os custos energéticos envolvidos no aquecimento e o tempo envolvido no processo de extração sugere-se adotar as condições de extração de 40°C por um período de 30 min, visto os resultados analíticos serem próximos.

A Figura 3.15 B corresponde aos teores de flavonoides totais, sendo que os teores mais elevados obtiveram-se à temperatura de 40°C e com 30 min de extração.

A Figura 3.15 C corresponde aos teores de poder redutor, e tendo em conta os custos energéticos envolvidos, as condições analíticas para o qual se consegue obter bons teores de antioxidantes é à temperatura de 25°C durante 30 min.

Relativamente ao DPPH (Figura 3.15 D), as melhores condições de extração são 5 min a 25°C, que se sobrepõem à temperatura de 40°C a 5 min por questões energéticas. Analisando todos estes dados sugere-se que as condições ideais de extração são de 40°C e de 30 min.

3.6. Capacidade antioxidante dos subprodutos da vinha e do vinho

Na tabela 3.2 apresenta-se um resumo das várias condições ideais para a etapa de extração dos compostos antioxidantes dos diversos subprodutos estudados.

Tabela 3.2: Condições de extração ideais para os diferentes sub-produtos utilizados.

Sub-produtos	Condições da extração		
	Razão de solvente	Temperatura	Tempo (min)
	(água/etanol, V/V)	(°C)	
Folhas	50/50	40	30
Caules	50/50	40	30
Bagaço	50/50	55	30
Engaço	50/50	40	5
Grainha	50/50	40	30

A Figura 3.16, resume os teores dos compostos com capacidade antioxidante para os vários sub-produtos nas condições selecionadas apresentadas na Tabela 3.2.

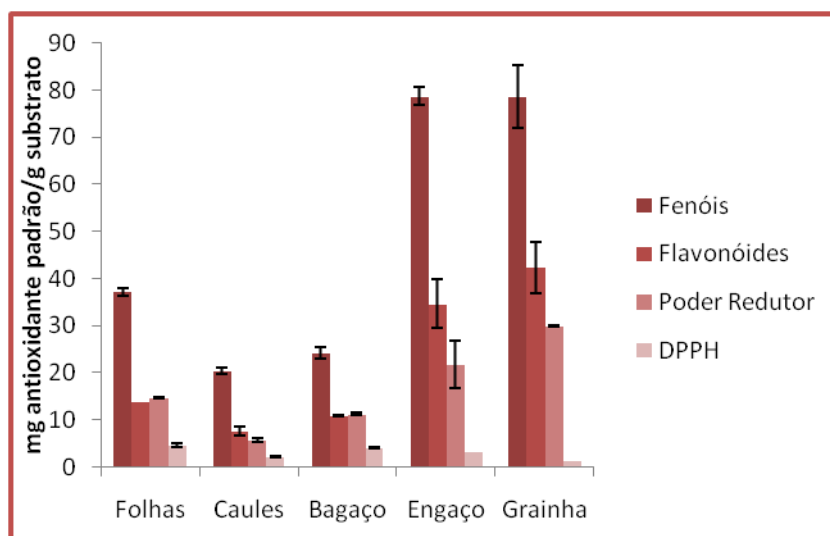


Figura 3.16: Capacidade antioxidante total para os vários sub-produtos obtidos nas condições de extração ideais.

A Figura 3.16 permite efetuar uma comparação dos valores obtidos para a capacidade antioxidante total para os diferentes sub-produtos estudados e nas condições experimentais de extração previamente selecionadas. Conforme se pode observar o engaço e a grainha são os sub-produtos mais ricos em compostos fenólicos, flavonoides e poder redutor.

Relativamente à capacidade anti-radicalar determinada com o DPPH os valores são mais elevados para as folhas.

4. Conclusões e Sugestões para trabalhos futuros

Este trabalho consistiu em avaliar os teores de polifenóis existentes em extratos preparados a partir de sub-produtos da vinha e do vinho nomeadamente, folhas, caules, bagaço, engaço e grainha. Os parâmetros experimentais da extração foram otimizados, incluindo a proporção de solvente de extração (água / etanol), a temperatura e o tempo de extração. A quantificação dos polifenóis e da capacidade antioxidante total foi efetuada usando métodos espectrofotométricos de UV-Vis.

As condições ideais para a extração dos compostos com propriedades antioxidantes das folhas de videira, e não menosprezando as questões económicas e ambientais foram para a temperatura de extração de 40°C, usando uma mistura de extração água/etanol 50/50 % (V/V) para um período de extração de 30 min. Para aos caules de videira as condições ideais foram as mesmas que se verificaram para as folhas.

Relativamente ao bagaço, as condições ideais para se realizar a extração foram a utilização de uma temperatura de extração de 55°C por um período de 30 min e utilizando uma mistura de extração com 50/50% de água/etanol.

Para a extração dos compostos com maior capacidade antioxidante do engaço, as condições ideais foram obtidas à temperatura de 40°C por um período de 5 min, utilizando uma mistura de extração com 50/50% de água/etanol.

Para os ensaios efetuados à grainha, e após analisar os vários gráficos apresentados, as condições ideais de extração foram de 50/50% de água/etanol a 40°C durante 30 min.

Como trabalho futuro sugere-se fazer a identificação e a quantificação, por cromatografia líquida, dos diferentes compostos antioxidantes existentes nos extratos dos subprodutos da vinha e do vinho de modo a saber qual o contributo de cada antioxidante nos teores finais totais.

Considerando que Portugal é rico em subprodutos quer da agricultura quer da floresta seria muito importante alargar este trabalho e tentar extrair e quantificar os compostos antioxidantes de outras matrizes. Finalmente seria primordial encontrar uma aplicação industrial, cosmética ou alimentar, para este estudo.

5. Bibliografia

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006), Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chemistry*, 99, 191-203.

Cardoso, A. D. (2007), *O Vinho da Uva à Garrafa*, Âncora Editora.

Cataneo, C. B., Caliari, V., Gonzaga, L. V., Kuskoski, E. M., Fett, R. (2008), Antioxidant activity and phenolic content of agricultural by-products from wine production, *Ciências Agrárias*, Londrina, 93-102.

Fu, L., Xu, B. T., Xu, X. R., Gan, R. Y., Zhang, Y., Xia, E. Q., Li, H. B., (2011) Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits, *Food Chemistry*, 129, 345-350

Hatano, T. K., Kagawa, H., Yasuhara, T., Okuda, T. (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects, *Chemical Pharmacology Bulletin*, 36, 2090–2097.

Oyaizu, M. (1986), Studies on products of browning reaction, *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307- 315.

Rockenbach, I.I. (2008). Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, 238-44.

Silva, M. L.C., Costa, R. S., Santana, A. S., Koblitz, M. G. M. (2010), Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products, *Ciências Agrárias*, Londrina, 31, 669-682.

Vedana, M. I. S., Ziemer, C., Miguel, O. G., Portella, A. C., Candido, L. M.B., (2008). Efeito do processamento na atividade antioxidante da uva, *Alim. Nutr. Araraquara*, 19, 159-165.

<http://pt.wikipedia.org/wiki/Fenol>, acessado em 12 de Março de 2012.

<http://pt.wikipedia.org/wiki/Vinho>, acessado em 27 de fevereiro de 2012.

http://www.aesbuc.pt/twt/etgi/myfiles/meussites/enologia/2005/prensagem_vt.htm,

Obtido em 15 de Março de 2012.

<http://www.portugalweb.pt/>, acessado em 27 de fevereiro de 2012.

<http://www.wedotech.eu/wedotech.php>, acessado em 13 de Setembro de 2012.

http://cientifico.cardiol.br/cardiosource2/doenca-art-ronaria/int_artigo20.asp?cod=108, acessado em 05 de Março de 2012.

<http://www.ipv.pt/millenum/millenum28/10.pdf>, acessado em 02 de março de 2012.

<http://www.mundoeducacao.com.br/quimica/fenoiis.htm>, acessado em 05 de Março de 2012.

Anexos

A. Resultados experimentais

Tabela A.1: Condições de extração e teores médios de fenóis, flavonóides, poder redutor e DPPH nas folhas.

Produto	VH ₂ ON/C ₂ H ₆ O %	Temperatura °C	Tempo min	Fenóis	Flavonoides	Poder	DPPH (média) mg/g
				(média) mg/g	(média) mg/g	Redutor (média) mg/g	
Folhas	100/0	40	60	21,10±1,25	8,03±0,31	11,08±0,29	2,57±0,07
	80/20	40	60	30,13±1,86	13,22±0,31	14,99±0,02	3,79±0,10
	50/50	40	60	35,35±1,43	17,44±1,19	19,26±0,67	5,11±0,15
	20/80	40	60	28,40±0,43	11,08±0,06	14,83±0,26	3,64±0,18
	0/100	40	60	17,08±0,22	7,27±0,44	8,92±0,86	2,76±0,22
	100/0	40	30	19,47±0,28	10,26±0,19	7,79±0,95	3,27±0,01
	80/20	40	30	32,57±0,42	11,05±0,94	12,58±0,10	4,24±0,28
	50/50	40	30	37,27±0,82	13,74±0,00	14,65±0,19	4,58±0,42
	20/80	40	30	29,54±1,87	13,55±0,37	11,16±0,02	3,44±0,28
	0/100	40	30	19,67±0,35	7,94±0,68	6,14±0,17	1,75±0,02
	100/0	25	60	8,23±0,57	1,98±0,11	1,48±0,32	1,81±0,09
	80/20	25	60	9,55±0,07	2,59±0,01	2,20±0,35	1,89±0,05
	50/50	25	60	11,35±0,07	4,02±0,02	3,63±0,08	2,15±0,12
	20/80	25	60	7,80±0,32	3,38±0,06	2,04±0,12	1,68±0,02
	0/100	25	60	4,21±0,05	ND	1,09±0,15	1,44±0,05
	100/0	25	30	5,67±0,05	1,63±0,01	1,19±0,08	ND
	80/20	25	30	9,67±0,50	1,45±0,11	2,04±0,02	0,25±0,00
	50/50	25	30	10,77±0,21	2,60±0,05	2,79±0,08	0,50±0,16
	20/80	25	30	6,88±0,14	2,14±0,02	1,35±0,00	0,01±0,04
	0/100	25	30	4,19±0,33	ND±	0,69±0,00	0,07±0,07
	100/0	100	60	33,00	19,48	17,17	6,22
	100/0	100	30	32,14	19,93	12,09	5,44
	100/0	55	60	28,31±0,02	14,22±0,26	11,39±0,02	0,24±0,71
	80/20	55	60	36,82±0,35	18,92±1,09	14,75±1,45	2,32±0,21
	50/50	55	60	42,18±1,45	20,83±4,51	17,07±0,60	3,31±0,02
	20/80	55	60	21,68±0,40	11,32±0,18	9,19±0,00	3,75
	0/100	55	60	15,55±0,73	11,31±0,77	5,94±0,01	1,62

	100/0	55	30	29,55±0,33	13,93±0,38	12,31±0,19	1,91
	80/20	55	30	39,77±5,81	16,82±0,24	13,52±1,22	2,30±0,07
	50/50	55	30	39,24±0,00	18,21±2,27	11,96±2,94	3,21±0,28
	20/80	55	30	17,92±0,14	7,88±1,65	7,05±0,05	3,93
	0/100	55	30	14,17±2,15	6,63±0,06	4,95±0,02	2,72±

Tabela A.2: Condições de extração e teores médios de fenóis, flavonóides, poder redutor e DPPH nos caules.

Produto	VH ₂ O/VC ₂ H ₆ O %	Temperatura °C	Tempo min	Fenóis	Flavonoides	Poder Redutor	DPPH
				(média) mg/g	(média) mg/g	(média) mg/g	(média) mg/g
Caules	100/0	40	60	6,86±0,40	2,55±0,13	1,27±0,02	0,93±0,05
	80/20	40	60	13,26±0,33	5,39±0,18	4,32±0,99	2,04±0,03
	50/50	40	60	21,38±0,10	7,65±0,45	5,79±0,15	3,21±0,19
	20/80	40	60	16,29±1,04	5,58±0,19	4,77±0,02	2,22±0,12
	0/100	40	60	7,83±0,09	2,77±0,19	1,97±0,13	1,31±0,11
	100/0	40	30	5,68±0,26	2,34±0,46	2,01±0,36	0,89±0,04
	80/20	40	30	14,25±0,66	5,75±0,00	4,34±0,19	1,88±0,14
	50/50	40	30	20,31±0,66	7,73±0,94	5,70±0,47	2,26±0,13
	20/80	40	30	16,36±0,02	6,86±0,06	4,54±0,13	1,47±0,29
	0/100	40	30	10,23±0,76	3,94±0,00	1,89±0,04	0,51±0,13
	100/0	25	60	5,30±0,12	2,81±0,13	1,99±0,02	1,51±0,10
	80/20	25	60	10,97±0,52	4,70±0,06	3,09±0,21	2,03±0,08
	50/50	25	60	15,90±0,35	5,83±0,00	4,79±0,55	2,26±0,07
	20/80	25	60	15,36±0,19	5,79±0,06	3,80±0,13	2,30±0,11
	0/100	25	60	6,40±0,17	2,24±0,20	1,90±0,77	1,48±0,03
	100/0	25	30	5,76±0,59	2,32±0,06	1,78±0,02	1,46±0,13
	80/20	25	30	8,84±0,26	4,36±0,32	3,31±0,17	1,80±0,09
	50/50	25	30	16,37±0,60	6,54±0,25	4,87±0,10	2,43±0,04
	20/80	25	30	13,82±0,37	5,43±0,32	3,70±0,19	2,17±0,08
	0/100	25	30	6,00±0,21	2,81±0,02	1,16±0,19	1,37±0,04
100/0	100	60	12,58	4,97	5,78	1,85	
100/0	100	30	9,08	5,34	4,36	1,80	
100/0	55	60	7,62±0,03	2,87±0,01	2,16±0,04	0,29	

	80/20	55	60	15,56±0,05	5,71±0,25	4,01±1,39	0,80
	50/50	55	60	23,31±0,22	9,78±1,77	6,78±0,46	1,25
	20/80	55	60	17,30±1,38	5,21±0,91	3,61±0,09	0,77
	0/100	55	60	12,41±0,00	3,60±0,00	2,29±0,06	0,70
	100/0	55	30	7,45±0,37	2,38±0,27	2,29±0,22	1,27
	80/20	55	30	15,85±0,23	5,18±0,31	3,72±0,28	1,13
	50/50	55	30	23,72±0,37	6,59±0,44	5,93±0,33	0,61
	20/80	55	30	9,65±1,89	2,51±0,98	2,51±0,05	1,21
	0/100	55	30	7,10±0,90	0,77±0,06	1,62±0,03	1,45

Tabela A.3: Condições de extração e teores médios de fenóis, flavonóides, poder redutor e DPPH no bagaço.

Produto	VH ₂ O/V C ₂ H ₆ O %	Temperatura °C	Tempo min	Fenóis	Flavonoides	Poder Redutor	DPPH
				(média) mg/g	(média) mg/g	(média) mg/g	(média) mg/g
Bagaço	0/100	25	5	3,90±0,05	2,21±0,20	1,30±0,04	0,77±0,48
	50/50	25	5	9,56±0,11	4,42±0,29	3,98±0,10	1,51±0,78
	100/0	25	5	2,11±0,22	1,03±0,02	0,46±0,09	0,68±0,50
	0/100	25	15	10,50±0,41	5,23±1,01	4,58±0,04	1,46±0,42
	50/50	25	15	5,43±0,17	2,58±0,28	1,89±0,17	0,86±0,35
	100/0	25	15	2,64±0,14	1,09±0,10	0,66±0,06	0,22±0,14
	0/100	25	30	6,29±0,14	2,50±0,06	3,47±1,41	1,57±0,17
	50/50	25	30	13,34±0,33	6,35±0,06	7,51±3,71	2,56±0,08
	100/0	25	30	4,96±0,05	1,26±0,06	6,93±0,73	0,47±0,06
	0/100	25	60	6,73±0,00	2,59±0,13	2,58±0,75	1,05±0,18
	50/50	25	60	15,01±1,15	6,76±0,19	6,13±0,44	2,21±0,04
	100/0	25	60	6,22±0,20	2,60±0,12	1,72±0,06	1,11±0,03
	0/100	40	5	4,18±0,11	3,15±0,36	2,34±0,26	0,25±0,11
	50/50	40	5	7,60±0,16	5,29±0,31	4,08±0,06	1,00±0,20
	100/0	40	5	2,32±0,22	1,63±0,12	1,24±0,04	ND±0,08
	0/100	40	15	6,42±0,17	2,78±0,58	2,95±0,02	0,81±0,01
	50/50	40	15	12,47±0,62	10,54±0,18	7,17±0,20	2,17±0,03
	100/0	40	15	4,14±0,38	3,16±0,48	1,95±0,26	ND±0,08
	0/100	40	30	7,28±0,31	4,80±0,78	2,12±0,13	0,86±0,02
	50/50	40	30	15,31±0,35	8,33±0,13	6,74±0,02	2,87±0,30

100/0	40	30	5,68±0,20	3,96±0,00	2,14±0,10	0,49±0,02
0/100	40	60	7,76±0,07	6,68±0,19	3,07±0,13	1,08±0,22
50/50	40	60	14,32±0,47	10,43±1,85	6,98±0,40	2,48±0,15
100/0	40	60	5,92±0,31	3,55±0,65	2,46±0,34	0,53±0,04
0/100	55	5	7,62±0,19	2,21±0,19	2,71±0,08	2,41±0,78
50/50	55	5	15,94±0,05	6,26±0,25	5,13±0,35	3,93±0,44
100/0	55	5	5,81±0,17	1,00±0,13	1,48±0,06	1,07±0,65
0/100	55	15	7,69±0,20	2,35±0,30	2,53±0,08	1,89±0,37
50/50	55	15	18,25±0,55	8,25±1,16	7,70±1,18	4,46±0,73
100/0	55	15	7,09±0,46	1,95±0,13	2,72±0,09	0,58±0,66
0/100	55	30	9,27±0,00	2,99±0,06	5,23±0,12	1,00±0,17
50/50	55	30	24,28±1,27	10,99±0,17	11,27±0,34	4,00±0,11
100/0	55	30	11,31±0,10	3,13±0,26	6,39±0,04	0,86±0,32
0/100	55	60	12,65±0,36	3,78±0,20	6,19±0,20	1,08±0,25
50/50	55	60	25,63±0,75	10,64±0,50	10,79±0,71	5,17±0,24
100/0	55	60	13,48±0,43	4,44±0,24	7,82±0,35	2,39±0,73
100/0	100	5	11,31±0,26	0,50±0,06	3,60±0,06	0,77±0,00
100/0	100	15	15,79±1,60	7,47±0,32	6,64±0,21	1,38±0,07
100/0	100	30	15,17±0,38	0,81±0,45	6,54±0,17	1,47±0,15
100/0	100	60	22,04±2,52	9,37±0,25	7,76±1,39	1,79±0,11

Tabela A.4: Condições de extração e teores médios de fenóis, flavonóides, poder redutor e DPPH no engaço.

Produto	VH ₂ O/VC ₂ H ₆ O %	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Fenóis (média) mg/g	Flavonoides (média) mg/g	Poder Redutor (média) mg/g	DPPH (média) mg/g
Engaço	0/100	25	5	10,26±1,24	3,58±0,13	2,76±0,53	0,29±0,03
	50/50	25	5	77,14±0,00	26,42±2,55	35,44±3,10	0,83±0,02
	100/0	25	5	37,05±0,65	14,03±0,00	19,35±0,36	0,15±0,01
	0/100	25	15	79,82±6,65	24,86±0,45	51,17±1,62	0,70±0,03
	50/50	25	15	11,54±3,12	4,57±0,12	5,02±0,22	0,26±0,01
	100/0	25	15	49,47±0,23	10,81±0,25	22,86±2,47	0,43±0,04
	0/100	25	30	15,52±0,14	3,34±0,13	5,84±0,99	0,21±0,01

Valorização de Subprodutos da Vinha e do Vinho: impacto do tempo e métodos de preservação nas suas características

50/50	25	30	69,15±5,42	18,85±1,75	45,61±9,12	0,74±0,05
100/0	25	30	45,73±7,38	9,36±0,00	23,36±0,84	0,43±0,03
0/100	25	60	18,21±0,64	3,94±0,31	8,16±0,14	0,16±0,02
50/50	25	60	85,14±3,75	17,80±0,89	48,54±4,20	0,82±0,02
100/0	25	60	43,13±4,19	11,36±1,43	20,94±4,77	0,24±0,01
0/100	40	5	15,15±1,12	5,84±0,33	3,26±0,09	0,30±0,00
50/50	40	5	78,67±1,87	34,65±5,10	21,88±5,02	1,30±0,04
100/0	40	5	48,86±5,26	24,65±0,65	12,27±0,64	3,15±0,04
0/100	40	15	28,31±1,51	12,83±1,29	5,93±0,66	0,25±0,02
50/50	40	15	96,19±10,97	46,20±2,28	38,36±1,07	1,04±0,13
100/0	40	15	71,59±0,95	25,45±0,97	22,38±0,11	1,36±0,11
0/100	40	30	24,82±2,18	14,75±1,52	6,51±0,25	0,22±0,02
50/50	40	30	112,82±1,51	47,09±0,63	32,77±1,77	1,09±0,01
100/0	40	30	71,05±2,13	26,91±1,29	16,64±0,64	1,34±0,12
0/100	40	60	33,72±3,05	18,16±0,46	7,29±0,19	0,21±0,04
50/50	40	60	122,27±1,40	60,85±0,32	46,46±0,00	0,99±0,18
100/0	40	60	77,83±0,62	26,39±0,34	27,51±1,11	1,43±0,02
0/100	55	5	22,32±0,71	2,47±0,32	6,22±0,53	1,76±0,01
50/50	55	5	114,46±6,04	54,42±0,90	39,01±4,03	0,61±0,03
100/0	55	5	83,69±7,46	26,00±3,88	27,88±0,42	1,18±0,18
0/100	55	15	31,81±2,38	7,98±0,32	9,10±0,11	1,63±0,16
50/50	55	15	115,58±4,93	54,23±7,87	39,12±4,52	0,37±0,05
100/0	55	15	82,93±2,06	29,82±4,62	22,36±4,55	0,96±0,04
0/100	55	30	35,20±1,42	4,52±0,65	7,94±2,12	1,62±0,07
50/50	55	30	123,51±4,76	66,59±2,60	46,68±8,00	0,63±0,02
100/0	55	30	88,90±0,12	35,27±6,49	31,31±2,77	1,29±0,06
0/100	55	60	42,23±2,32	10,03±3,48	11,46±6,03	1,43±0,21
50/50	55	60	130,51±4,58	75,36±5,36	48,87±4,59	0,65±0,02
100/0	55	60	88,50±11,22	41,50±0,62	34,23±5,54	1,19±0,11
100/0	100	5	87,57±8,77	35,64±4,53	28,45±0,11	1,13±0,08
100/0	100	15	109,65±13,72	45,24±0,31	34,39±2,74	0,78±0,25
100/0	100	30	114,14±3,74	53,33±2,47	38,33±3,65	0,90±0,03
100/0	100	60	117,44±2,58	49,33±6,12	42,92±2,21	0,57±0,03

Tabela A.5: Condições de extração e teores médios de fenóis, flavonóides, poder redutor e DPPH na grainha.

Produto	VH ₂ O/VC ₂ H ₆ O%	Temperatura °C	Tempo (min)	Fenóis (média) mg/g	Flavonoides (média) mg/g	Poder Redutor (média) mg/g	DPPH (média) mg/g
Grainha	0/100	25	5	43,55±1,55	16,32±0,98	14,52±1,50	1,38±0,07
	50/50	25	5	55,05±1,53	23,63±3,86	20,02±4,44	1,26±0,00
	100/0	25	5	31,97±0,04	16,43±2,47	11,01±0,92	0,28±0,02
	0/100	25	15	45,34±2,93	19,61±0,96	17,64±3,35	1,23±0,05
	50/50	25	15	62,36±2,43	24,24±1,98	27,97±2,28	0,83±0,08
	100/0	25	15	35,46±0,34	17,58±0,00	12,46±0,17	0,33±0,02
	0/100	25	30	55,38±6,62	19,85±0,89	18,82±2,53	1,19±0,02
	50/50	25	30	69,85±0,61	27,06±0,66	30,21±2,60	1,15±0,02
	100/0	25	30	29,47±3,02	19,35±2,24	17,50±2,03	0,27±0,00
	0/100	25	60	48,02±5,92	22,17±1,52	19,81±1,40	1,19±0,05
	50/50	25	60	69,30±0,68	30,43±0,62	24,43±1,21	0,89±0,05
	100/0	25	60	35,45±0,60	26,57±2,60	15,48±2,77	0,25±0,03
	0/100	40	5	41,31±0,65	14,82±0,89	11,19±1,84	1,59±0,02
	50/50	40	5	61,89±0,46	24,91±1,56	19,50±0,10	1,44±0,02
	100/0	40	5	41,49±2,32	20,80±0,13	17,57±1,37	0,40±0,04
	0/100	40	15	39,39±1,90	19,55±1,73	11,65±1,89	1,45±0,04
	50/50	40	15	74,79±0,23	30,74±2,78	26,08±2,23	1,26±0,05
	100/0	40	15	37,43±0,33	20,27±2,58	14,96±1,48	0,36±0,01
	0/100	40	30	57,04±1,35	24,86±2,76	15,49±1,81	1,28±0,02
	50/50	40	30	78,56±6,68	42,32±5,56	29,95±0,20	0,98±0,07
	100/0	40	30	41,81±2,37	20,69±0,37	16,94±0,16	0,26±0,02
	0/100	40	60	57,43±2,81	26,01±1,84	20,45±2,92	1,37±0,10
	50/50	40	60	77,70±2,09	34,74±0,95	22,98±4,37	1,29±0,04
	100/0	40	60	35,80±3,42	19,70±3,39	16,43±0,08	0,31±0,03
	0/100	55	5	43,30±1,20	13,37±1,96	12,22±0,75	1,61±0,03
	50/50	55	5	59,47±1,33	22,85±0,30	17,76±0,30	1,33±0,04
	100/0	55	5	34,58±0,95	15,25±0,86	12,59±0,40	0,41±0,01
	0/100	55	15	45,97±2,10	15,50±0,96	14,49±1,67	1,51±0,02
50/50	55	15	67,61±1,80	29,09±3,07	22,83±0,61	1,14±0,00	

100/0	55	15	40,46±1,80	19,38±1,04	14,32±0,89	0,37±0,02
0/100	55	30	58,35±0,24	20,53±0,33	14,72±0,43	1,39±0,06
50/50	55	30	83,61±2,12	32,04±4,18	27,10±1,16	1,16±0,08
100/0	55	30	41,70±0,64	18,85±0,63	14,27±0,45	0,29±0,04
0/100	55	60	67,52±1,11	26,78±1,52	21,19±0,30	1,21±0,06
50/50	55	60	89,55±2,62	36,29±0,00	31,77±1,39	1,13±0,10
100/0	55	60	44,70±0,75	22,12±1,28	17,29±1,73	0,28±0,03
100/0	100	5	52,24±0,89	31,38±1,58	20,10±0,40	0,30±0,19
100/0	100	15	67,71±1,80	39,03±3,10	27,28±1,91	0,15±0,05
100/0	100	30	67,96±1,46	41,68±1,54	27,28±0,38	0,17±0,02
100/0	100	60	73,71±3,21	48,56±2,39	30,65±1,74	0,11±0,00