

DIRSEU GALLI

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTOCIANINAS NO RESÍDUO DE
UVAS PROCESSADAS**

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2010**

DIRSEU GALLI

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTOCIANINAS NO RESÍDUO DE
UVAS PROCESSADAS**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Maringá,
como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em
Agronomia, área de concentração em
Produção Vegetal para obtenção do
título de Mestre.

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2010**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G168 Galli, Dirceu
Extração e caracterização de Antocianinas no
resíduo de uvas processadas / Dirceu Galli. --
Maringá: [s.n.], 2010.
71 f.

Orientador : Prof° Dr° Edmar Clemente.
Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação
em Agronomia. Universidade Estadual de Maringá.

1. *Vitis Labusca*. 2. Ácidos orgânicos. 3.
Antocianinas - Caracterização. 4. Antocianinas -
Pigmentação. I. TÍTULO

CDD 21. ed. 634.8

Dedico à minha esposa, Dalva M.Malavazi Galli, pela dedicação e aos meus filhos, Rodrigo Malavazi Galli, pela insistência, e Renan Malavazi Galli, Renato Malavazi Galli, pelo apoio.

AGRADECIMENTO

À sabedoria que a vida proporciona as grandes oportunidades.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade oferecida.

Ao Professor PhD, Edmar Clemente, pela orientação e confiança depositada em mim.

Ao Laboratório de Agroquímica e Meio Ambiente da Universidade Estadual de Maringá, pelo apoio na realização do Mestrado em agronomia.

Ao amigo, Prof. Dr. Ervim Lenzi, pela experiência de vida.

À Técnica de laboratório, Sandra Adriana Ricardo de Mello.

À Prof^a Dr^a Eurica Mary Nogami, pela confiança.

Ao Prof. Dr. Cláudio Celestino de Oliveira, Coordenador do Mestrado em Química, pelo empréstimo do HPLC para a realização das análises.

À aluna do Doutorado em Química, Valquíria de Moraes Silva, pela dedicação no apoio nas análises no HPLC.

BIOGRAFIA

DIRSEU GALLI, filho de Cláudio Galli (*in memoriam*) e Amabile Pavan Galli, nasceu em Concórdia - Santa Catarina, em 04 de julho de 1953. Casado com Dalva Maria Malavazi Galli, e pai de três filhos.

Cursou Licenciatura em Química na Universidade Estadual de Maringá, no período de 1977 a 1983.

Químico responsável pelo Laboratório de Extensão, DQI/UEM no Laboratório de Agroquímica e Meio Ambiente da Universidade Estadual de Maringá, na área agronômica e metais pesados em efluente.

Em 2008, ingressou no Mestrado em Produção Vegetal, no Programa de Pós-graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Maringá, concluído em fevereiro de 2010.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE SÍMBOLOS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 ORIGEM DA UVA	3
2.1.1 Uva Bordô	3
2.1.2 Uva Isabel	4
2.2 HISTÓRIA DA VITICULTURA NO BRASIL	5
2.2.1 Viticultura do Norte do Paraná	7
2.3 INFLUÊNCIA NOS FATORES CLIMÁTICOS NA PRODUÇÃO DE UVAS	8
2.3.1 Temperatura	8
2.3.2 Precipitação	10
2.4 FONTES DE ANTOCIANINAS	11
2.5 ESTRUTURA QUÍMICA DAS ANTOCIANINAS	12
2.6 EFEITO DA DEGRADAÇÃO DAS ANTOCIANINA	15
2.6.1 Efeito da temperatura	16
2.6.2 Efeito da oxigenação	17
2.6.3 Efeito do pH	18
2.6.4 Solubilização das antocianinas	19
2.6.5 Efeito da luz	20
2.7 BIOSÍNTESE DAS ANTOCIANINAS	21
2.8 COMPOSTOS FENÓLICOS	23
2.9 RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES	23
2.10 COPIGMENTAÇÃO DAS ANTOCIANINAS	24
2.10.1 Copigmentação intramolecular	25
2.10.2 Copigmentação intermolecular	26

2.11 ANTOCIANINAS NO VINHO	27
2.12 ANTOCIANINAS PARA USO INDUSTRIAL	28
2.13 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBPRODUTOS DA VINIFICAÇÃO ...	29
2.13.1 Bagaço das uvas	30
2.13.2 Engaços	32
2.13.3 Folhelho	32
2.13.4 Grainha	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 COLETA DAS AMOSTRAS	34
3.2 ANÁLISE QUÍMICA DAS ANTOCIANINAS	35
3.2.1 Extração	35
3.2.2 Medidas de potencial de hidrogênio	36
3.2.3 Filtração	36
3.2.4 Determinação espectrofotométrica UV-Vis	37
3.2.5 Parâmetros de degradação	38
3.2.6 Determinação por HPLC	39
3.2.6.1 Equipamento	39
3.2.6.2 Reagentes	40
3.2.6.3 Separação das antocianinas	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA DAS ANTOCIANINAS TOTAIS	42
4.2 SEPARAÇÃO DAS FRAÇÕES DE ANTOCIANINAS POR HPLC	44
4.2.1 Separações das frações de antocianinas na uva Bordô ...	45
4.2.2 Separações das frações de antocianinas na uva Isabel ...	46
4.3 ESTABILIDADE COM ÁCIDOS ORGÂNICOS NO EXTRATO DO	
BAGAÇO	49
4.3.1 Adição de ácido cafeico	49
4.3.2 Adição de ácido p-cumárico	52
4.3.3 Adição de ácido ferúlico	56
5. CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Antocianinas mais encontradas nos alimentos frequentemente	12
Tabela 2	Composição físico-química do folhelho	33
Tabela 3	Composição média após a secagem das grainhas	33
Tabela 4	Teores de antocianinas totais, nas uvas e no resíduo de uvas, processadas	44
Tabela 5	Valores de referências de padrão com seu tempo de retenção de antocianinas de uvas vermelhas	45
Tabela 6	Comparação com o tempo de retenção de uvas vermelhas da Tabela 5, no espectro cromatográfico de HPLC da uva Bordô	46
Tabela 7	Comparação com o tempo de retenção de uvas vermelhas da Tabela 5 no espectro cromatográfico de HPLC da uva Isabel “in natura”	47
Tabela 8	Comparação pelo tempo de retenção em relação a uvas vermelhas, da Tabela 5 no espectro cromatográfico de HPLC, da mistura do resíduo das uvas processadas	49
Tabela 9	Retenção da cor (%R) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$), mistura de resíduo da uva processada, com adição de ácido cafeico	51
Tabela 10	Comparação pelo tempo de retenção em relação a uvas vermelhas, da Tabela 6 no espectro cromatográfico de HPLC da Figura 25, da mistura de resíduo de uvas processadas com 80% da uva Isabel e 20% da uva Bordô na adição de ácido cafeico	52
Tabela 11	Retenção da cor (%R) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$), mistura do resíduo de uvas processadas, com adição de ácido p-cumárico	54
Tabela 12	Comparação pelo tempo de retenção em relação a uvas vermelhas, da Tabela 5 no espectro cromatográfico de HPLC da Figura 28, da mistura do resíduo de uvas processada com 80% da uva Isabel e 20% da uva Bordô na adição de ácido p-cumárico	55

Tabela 13	Retenção da cor (%R) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$), da mistura do extrato de antocianinas no resíduo de uva com adição de ácido ferúlico	57
Tabela 14	Comparação do tempo de retenção em relação a uvas vermelhas, da Tabela 5 no espectro de cromatográfico de HPLC da Figura 31, do resíduo da mistura (80% da uva Isabel e 20% da uva Bordô) na adição de ácido ferúlico	59
Tabela 1A	Temperaturas médias no período de 2000-2009 em graus Celsius	67
Tabelas 2A	Médias mensais pluviométricas no período de 2000-2009	67
Tabela 3A	Médias mensais de evaporação no período de 2006-2008	68
Tabela 4A	Umidade relativa do ar % no período de 2006-2009	68
Tabela 5A	Absorbância por espectrofotometria UV-Vis na adição de concentrações do ácido ferúlico, em temperatura ambiente e sem luz	69
Tabela 6A	Absorbância por espectrofotometria UV-Vis na adição de concentrações do ácido p-cumárico, em temperatura ambiente e sem luz	69
Tabela 7A	Absorbância por espectrofotometria UV-Vis na adição de concentrações do ácido cafeico, temperatura ambiente e sem luz	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Uva Yves (Bordô) <i>Vitis labrusca</i> , amplamente cultivada no Brasil	3
Figura 2	Uva Isabel (<i>Vitis labrusca</i>), amplamente cultivada no Brasil ...	5
Figura 3	Mapa do Brasil representado a maior concentração na produção de uvas para elaboração de vinhos e sucos e uva de mesa	7
Figura 4	Médias mensais das temperaturas nos últimos dez anos da região de Maringá-PR	10
Figura 5	Médias mensais pluviométricas nos últimos dez anos da região de Maringá-PR	11
Figura 6	Estrutura química das antocianinas com suas substituições estruturais	13
Figura 7	Estrutura básica de uma antocianina	14
Figura 8	Possíveis transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH	15
Figura 9	Fontes de antocianinas nas diversas formas de cores encontradas na natureza	18
Figura 10	Reações em equilíbrio em relação à temperatura	20
Figura 11	Biossíntese das antocianinas	22
Figura 12	Estrutura mais importante dos ácidos cinâmicos	24
Figura 13	Distribuição dos principais compostos fenólicos na uva	31
Figura 14	Vista parcial da Cooperativa Agroindustrial dos Viticultores - Coaviti, ano dezembro de 2008 - Marialva-PR	34
Figura 15	Resíduo de uvas processadas em contêiner, com 20% da uva Bordô e 80% da uva Isabel	35
Figura 16	Equipamento utilizado para as análises espectrofotométricas UV-Vis, Marca Hitachi 2001	37

Figura 17	Equipamento de Cromatografia Líquida de alta Eficiência-HPLC	40
Figura 18	Espectro de absorção na região UV-Vis, da uva Bordô, (<i>Vitis Labrusca</i>), em condição, temperatura ambiente e na ausência de luz, realizado após a sua extração e filtração, com solução extratora (70 mL de etanol 70% e 30 mL de HCl 0,1% em pH 2,0)	42
Figura 19	Espectro de absorção na região UV-Vis, da uva Isabel (<i>Vitis Labrusca</i>), em condição, temperatura ambiente e na ausência de luz, realizado após a sua extração e filtração, com solução extratora (70 mL de etanol 70% e 30 mL de HCl 0,1% em pH 2,0)	43
Figura 20	Cromatograma de HPLC, comprimento de onda, 535 nm, solução extratora (70 mL de etanol 70% e 30 mL de HCl 0,1% em pH 2,0) e filtração a vácuo com papel Millipore de 0,45 µm, da uva Bordô	46
Figura 21	Cromatograma de HPLC, a 535 nm, após sua extração, e filtração com papel Millipore a 0,45µm, com solução extratora (70 mL de etanol 70% e 30 mL HCl 0,1% em pH 2,00) na uva Isabel	47
Figura 22	Cromatograma de HPLC, com o solução extratora (70 mL de etanol 70%, e 30 mL HCl 0,1% em pH 2,00), de antocianinas do resíduo de uvas processadas	48
Figura 23	Espectro de absorção na região UV-Vis, da mistura do resíduo da uva processada (<i>Vitis Labrusca</i>), na presença do ácido cafeico - Linha vermelha - sem tratamento, Linha azul com tratamento - (0,5: 1 p/v), Linha verde com tratamento - (0,8: 1 p/v), Linha marrom com tratamento - (1: 1 p/v), em condições de temperatura ambiente e na ausência de luz	50
Figura 24	Leituras de absorbância de antocianinas com concentração de ácido cafeico em tempo (dias). B=controle pH 2,0 temperatura ambiente no escuro: C = teste (0,5: 1 p/v) temperatura ambiente no escuro: D = teste (0,8:1 p/v) temperatura ambiente no escuro: E = teste(1:1 p/v) temperatura ambiente no escuro, comprimento de onda 535 nm	50
Figura 25	Espectro cromatográfico de HPLC, de antocianinas no resíduo de uva processada, com adição de ácido cafeico	52

Figura 26	Espectro de absorção na região UV-Vis, da mistura do resíduo da uva processada da uva, na presença do ácido p-cumárico. As linhas estão praticamente sobrepostas em 520 nm, nas concentrações do ácido, (0,5: 1 p/v); (0,8: 1 p/v); (1: 1 p/v), em condições de temperatura ambiente e na ausência de luz	53
Figura 27	Leituras de absorbância lidas em 520 nm, de antocianinas com ácido p-cúmarico em tempo (dias). B = controle pH, 2,0 temperatura ambiente no escuro: C = teste (0,5: 1 p/v) temperatura ambiente no escuro: D = teste (0,8: 1 p/v) temperatura ambiente no escuro: E = teste (1:1 p/v) temperatura ambiente no escuro	54
Figura 28	Espectro cromatográfico de HPLC, de antocianinas no bagaço de uva processada, com adição de ácido p - cúmarico, preparação, conforme Figura 27	55
Figura 29	Espectros de absorção na região UV-Vis da mistura do resíduo da uva processada (<i>Vitis Labrusca</i>), na presença do ácido ferúlico - Linha azul - com tratamento: (0,5: 1 p/v), Linha vermelha com tratamento : (0,8: 1 p/v), Linha verde - sem tratamento, linha da cor marrom (1: 1 p/v) em condições de temperatura ambiente e na ausência de luz	56
Figura 30	Leituras de absorbância de antocianinas com adição de ácido ferúlico em tempo (dias). B = controle pH 2,0 temperatura ambiente no escuro: C = teste (0,5: 1 p/v) temperatura ambiente no escuro: D = teste (0,8:1 p/v) temperatura ambiente no escuro: E = teste (1:1 p/v) temperatura ambiente no escuro	57
Figura 31	Cromatograma de HPLC, de antocianinas no extrato da mistura de resíduo de uvas processadas, com adição de ácido ferúlico	58
Figura 1A	Cromatograma sobreposto de HPLC, de antocianinas no resíduo de uva após o processamento, com adição de ácido orgânico ferúlico, e ácido orgânico cafeico	70
Figura 2A	Médias mensais da evaporação durante últimos três anos da região de Maringá-PR	71
Figura 3A	Umidade relativa do ar em %, referente aos meses do ano, durante últimos quatro anos da região de Maringá-PR	71

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celcius
$E^{1\%}_{1\text{ cm}}$	Coeficiente de absorvidade molar
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
Kg	kilo
L	litro
mg	miligramas
mL	mililitros
mm	mililitro
nm	nanômetros
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
pH	pH meter
p/v	Peso/volume
R	Retenção da cor
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida
UV-Vis	Ultravioleta visível
v/v	volume/volume
%	porcentagem
µL	microlitro

RESUMO

GALLI, Dirseu, MS, Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2010. **Extração e caracterização de antocianinas no resíduo de uvas processadas.** Professor orientador: Dr. Edmar Clemente.

A cor é um dos mais importantes atributos de qualidade de um alimento, que exerce enorme influência em seu valor estético, e serve de base para a aceitação de grande variedade de produtos alimentícios. As antocianinas são os mais conhecidos pigmentos naturais, que extraídos são usados na indústria de alimentos como pigmentos naturais. E no processo de fabricação do vinho, gera quantidade estimada em 20% do resíduo sólido do seu peso inicial, como os subprodutos da vinificação, que contêm em sua composição antocianinas do grupo dos compostos fenólicos, destacando atividades antioxidantes e propriedades antiinflamatórias e anticancerígenas. A recuperação desses compostos do resíduo industrial da viticultura pode ser uma forma de obtenção destes pigmentos de grande importância para a indústria alimentícia. Este trabalho tem como objetivo quantificar, caracterizar e avaliar a estabilidade usando ácidos orgânicos. A obtenção do extrato, 100 g de resíduo de uvas processadas, foi misturada com 100 mL de uma solução extratora que continha (70 mL de etanol 70% e 30 mL de HCl 0,1% em pH 2,0). A atividade das antocianinas totais foi realizada com um espectrofotômetro, em que foram observados 48,7 mg/100 g da mistura de uvas do processamento do vinho. Pode-se observar que nas uvas processadas, em 100 g de resíduo, foram encontradas 25,6 mg de antocianinas. Esse resultado mostra que o resíduo industrial da viticultura pode ser usado como fonte de obtenção de compostos de antocianinas, antes de o resíduo ser usado como fertilizantes orgânicos. Ácidos orgânicos (ácido cafeico, ácido p-cumárico e ácido ferúlico), foram usados para testar o efeito desses na estabilidade de antocianinas, uma vez que em condições normais de temperatura, o tempo de meia vida obtidas do resíduo foi de sete dias. O emprego dos ácidos cafeico e ácido p-cumárico, mostrou aumento no tempo de meia vida de 15 e 36 dias, respectivamente. Entretanto, o ácido ferúlico não apresentou resultado significativo. As

antocianinas que foram isoladas por HPLC são as seguintes: delphinidina 3-glicosídeo, cianidina 3-glicosídeo, petunidina 3-glicosídeo, peonidina 3-glicosídeo, malvidina 3-glicosídeo.

Palavra-chave: *Vitis labusca*, ácidos orgânicos, caracterização, pigmentação.

ABSTRACT

GALLI, Dirseu, M.S, State University of Maringá, February 2010. **Extraction and characterization of anthocyanins from the residue of processed grapes.** Advisor: Dr. Edmar Clemente.

Colour is one of the most important attributes involving food quality. It has an enormous influence on their aesthetic value and foregrounds the acceptance of a great variety of nutrition products. Anthocyanins are natural pigments used in the food industry. Wine production produces about 20% of solid residue from the initial weight. As a subproduct of processed grapes, its composition is made up of the phenolic group, especially anthocyanins. These compounds are highlighted by having antioxidant activities and anti-inflammatory and anticancer properties. Retrieval of such compounds from wine industrial residues can be a form of obtaining pigments which have a great importance within the food industry. The current research objective to quantify, characterize and carry out the stabilization of anthocyanins by organic acid. The extract, 100 g of residue of processed grapes, was mixed with 100mL of extraction solutions (70 mL ethanol 70% and 30 mL HCl 0.1%, at pH 2.0). Total anthocyanins activity was carried out using a spectrophotometer and 41.22 mg/100 g of grape mixture was analyzed after wine processing. Before the grapes were processed, 26.33 mg of anthocyanins were found in 100g of residue. Results showed that the industrial viticulture residue may be used as a source to obtain anthocyanins compounds prior to the residue being used as an organic fertilizer. Organic acids (caffeic acid, p-cumaric acid and ferulic acid) were used to test their effect within anthocyanins stability since in normal conditions the half-life of anthocyanins obtained from the residue was of 7 days. The employment of caffeic and p-cumaric acids showed an increase in half-life to 15 and 36 days respectively. However, ferulic acid failed to show any significant results. Anthocyanins were isolated with HPLC and the following anthocyanins: delphinidine-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside, petunidine-3-glycoside, peonidine-3-glycoside, malvidine-3-glycoside were found in the processed grapes residue.

Keywords: *Vitis labusca*, organic acids, characterization, pigmentation.

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda por alimentos saudáveis vem acompanhada pela busca de produção, acarretando para a indústria de alimentos custos cada vez maiores para o tratamento de resíduos líquidos e sólidos que são gerados pelo processamento. A indústria da uva corresponde pelo volume substancial de resíduos orgânicos, e como subproduto representa aproximadamente 20% das uvas colhidas (LAUFENBERG; HUNZ; NYSTROEM, 2003).

A maior produção mundial após a laranja é a uva, com 61 milhões toneladas por ano, que é cultivada principalmente como a *Vitis vinifera* para a produção de vinho (SCHIEBER; STINTZING; CARLE, 2002). Os principais subprodutos da vinificação são separados nas etapas de esmagamento e prensagem das uvas, mas pequenas quantidades desses resíduos são aproveitadas e valorizadas (TORRES; DANGL; JONES, 2002). A recuperação das antocianinas, a partir do resíduo das indústrias da uva, pode ter contribuição importante para o meio ambiente, porque as indústrias da uva detêm grande quantidade de resíduos gerados, apresentando grandes problemas com armazenamento, a fim de evitar a contaminação ambiental. Com isso, os pesquisadores têm grandes interesses em explorar esses subprodutos do processamento de uvas. A exigência do consumidor quanto à qualidade dos alimentos, bem como ações legislativas para redução do uso de corantes sintetizados quimicamente em alimentos, têm aumentado o interesse pelo desenvolvimento de corantes de fontes naturais. Entretanto, a utilização de antocianinas nas indústrias de alimentos e de cosméticos ainda é restrita pela sua baixa estabilidade em meios aquosos e pH acima de 2,0. Essa desvantagem e essa percepção do consumidor de que pigmentos naturais são mais saudáveis, e que podem gerar vários estudos.

Estudos químicos que envolvem os elementos do vinho, ao que se refere ao resíduo, têm sido pouco estudados. No entanto, ele é rico em nutrientes minerais e seus compostos antioxidantes, a exemplo das antocianinas (AMICO et al., 2004). O aproveitamento desse resíduo, agregado ao seu valor nutricional contribui para a diminuição do impacto ambiental

provocado pelo descaso das indústrias de vinho. Alguns extratos vegetais contendo antocianinas já estão sendo comercializados na forma de concentrados do bagaço da uva, conhecido como enocianina. O objetivo deste estudo é quantificar e caracterizar antocianinas no resíduo de uva processada, utilizando um solvente extrator, de menor custo e menos nocivo para a utilização nas indústrias de alimentos, farmacêutica e outros segmentos que possam utilizar esse pigmento sem contaminação. Como as antocianinas degradam facilmente, foram realizados estudos com ácidos orgânicos, como estabilizantes para aumentar o tempo de meia vida das antocianinas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ORIGEM DA UVA

2.1.1 Uva Bordô

A cultivar Bordô, ou Yves originária dos EUA, (Figura 1) é uma das principais videiras de *Vitis labrusca*, fácil de ser cultivada pela sua rusticidade e tolerância à alta umidade relativa no ar. No século XVIII, despertou interesse dos viticultores europeus pela sua resistência ao Oídio (*Uncinula necator*), doença que naquela época causava enorme prejuízo à viticultura mundial. Em 1839, sua expansão deu-se pela fácil adaptação às condições climáticas, boa produtividade e longevidade da uva Bordô que apresentava aroma e gosto foxado pelo hábito de consumo.



Figura 1 – Uva Yves (Bordô) (*Vitis labrusca*), amplamente cultivada no Brasil.

No Brasil, é conhecido por nomes regionais como 'bordô' no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina; 'Terci' no Paraná e 'Folha de Figo' em Minas Gerais. Esta cultivar de uva tinta tem grande importância comercial só

em regiões com inverno bem definido, apresentando dificuldade nas regiões de clima tropical. As cultivares americanas da espécie *Vitis labrusca* produzem uvas de qualidade inferior para a vinificação, porém são aptas à elaboração de sucos e apreciadas para consumo e apresenta alta concentração de material corante, motivo principal de sua significativa difusão. Origina vinho e suco intensamente coloridos que, em cortes, servem para a melhoria da cor dos produtos à base de uvas Isabel, Concord.

2.1.2 Uva Isabel

A uva Isabel (*Vitis labrusca*). (Figura 2) originária do Sul dos Estados Unidos é uma cultivar de uva tinta, muito rústica e altamente produtiva, que proporciona colheita abundante com poucas intervenções de manejo, cujo destino principal é a Serra Gaúcha-RS. Trazida para o Brasil na década de 1830, tornou-se a principal cultivar em área de parreirais do país. Apresenta bom desempenho nos climas tropicais, com resultados positivos comprovados nos Noroeste de São Paulo, Triângulo Mineiro, Goiás e Mato Grosso, ocupando uma área, atualmente, de 30% da produção de uvas do território nacional. É uma cultivar que se destaca pela sua produtividade e pelo grande potencial no aumento de açúcar. Embora utilizada especialmente para elaboração de vinho e suco, também tem boa aceitação como uva de mesa. Cacho pequeno a médio, solto e a qualidade das bagas preta, média, levemente elipsoide, polpa mucilaginosa, desprende-se facilmente da película, tem sabor afroboesado e características organolépticas de aroma e sabor tradicional agradável das cultivares de *Vitis labrusca*. É comum a presença de bagas verdes, parcialmente desenvolvidas, nos cachos, o que implica em necessidade de toalete antes da comercialização. Dependendo das condições climáticas, ela atinge a maturação entre final de janeiro a início de março, constituindo-se em alternativa para produção em meia estação. É uma cultivar vigorosa e de alta fertilidade. Produz bem quando podada só a esporões, mas neste caso os cachos são menores. Está sujeita à incidência de antracnose e de míldio, com recomendação do uso de fungicidas preventivamente.



Figura 2 – Uva Isabel (*Vitis labrusca*), amplamente cultivada no Brasil.

2.2 HISTÓRIA DA VITICULTURA NO BRASIL

As primeiras videiras do Brasil foram trazidas, em 1532, pela expedição de Martim Afonso de Souza. Brás Cubas, fundador da cidade de Santos, é reconhecido como o primeiro a cultivar a vinha em nossas terras. Em 1813, D. João VI reconhece oficialmente a primazia de Manoel de Macedo Brum da Silveira, no plantio das videiras na produção de vinho no Rio Grande do Sul. Em 1840, introduziu a variedade Isabel por Thomas Máster na ilha dos marinheiros. A colonização no maior país da América do Sul, e com ela também a origem da viticultura, teve início na metade do século XVI, quando os portugueses plantaram as primeiras mudas na região de São Paulo, em 1532. No ano de 1626, os padres jesuítas plantaram as primeiras vinhas no Rio Grande do Sul. No entanto, com a destruição das Missões, houve o rompimento da atividade viticultura. O enólogo Auguste de St. Hilaire já afirmava, no ano de 1800, que as espécies de uvas europeias poderiam se adaptar melhor no Sul do país, na fronteira com o Uruguai, o que foi ignorado por quase 200 anos. Por volta de 1840, foi introduzida a espécie híbrida da videira Isabela, no Rio Grande do Sul. A produção significativa de vinho desenvolveu-se a partir de 1875, por meio dos imigrantes italianos da região do Vêneto e da Lombardia. Mais tarde, também imigrantes alemães passaram a produzir vinho. Os imigrantes trouxeram o Trebbiano e o Riesling. Pelas dificuldades com o clima, vários experimentos foram realizados, mas foi após a Primeira Guerra Mundial que as primeiras videiras se adaptaram. Grandes empresas internacionais se estabeleceram nas décadas de 1960 e 1970, por

exemplo, Bacardi-Martini, Cinzano, Heublein, Martini & Rossi, Moët et Chandon (com a Vinícola Chandon Brasil), Domecq e Seagram.

Em 2007, a produção de uva no Brasil foi de 1.354.960 toneladas, 11,04% superior ao ano de 2006. No Estado de São Paulo, destacam-se dois polos vinícolas, sendo um na região Noroeste (regional agrícola de Jales) e outro na região Leste (regionais agrícolas de Campinas, Itapetininga e Sorocaba). A região Leste, situada a 23°S, 47°W, entre 700 e 900 m de altitude, apresenta médias anuais de 1.400 mm de precipitação, temperatura média de 19,5°C e umidade relativa do ar de 70,6%. É uma região onde a altitude compensa a latitude, condicionando à prática de uma viticultura de clima temperado em Minas Gerais, região do Vale do São Francisco, Petrolina-PE, situada no trópico semiárido brasileiro, em latitude 9°S, longitude 40°W e altitude em torno de 350 m, apresenta indicadores climáticos médios de 500 mm de precipitação, temperatura média de 26°C e 50% de umidade relativa do ar. A precipitação pluviométrica está concentrada entre dezembro e março. Trata-se da principal região vinícola tropical do Brasil, que possui cerca de 8.000 ha de vinhedos distribuídos nos Estados de Pernambuco e Bahia (PROTAS; CAMARGO; MELO, 2005). O maior acréscimo da produção ocorreu no Estado da Bahia, seguidos pelo Estado de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Do total das uvas produzidas no Brasil, em 2007, foram 47,02% destinados à elaboração de vinhos, sucos e outros derivados, 35,35% a mais que em 2006, quando que o total da uva destinada ao processamento representando 38,32% (MELLO, 2000, 2007, 2008).

A produção de uva no Brasil, em 2008, foi de 1.399.262 toneladas, 3,27% superior a 2007. Do total das uvas produzidas no Brasil, 50% foram destinados à elaboração de vinhos, sucos e outros derivados. O principal produtor foi Rio Grande do Sul com 776.027 toneladas e o Paraná com 101.500 toneladas (IBGE, 2008).

A produção brasileira de vinho, embora não a de uva, está muito concentrada em uma região relativamente pequena do Rio Grande do Sul. Além disso, a maior parte da produção de vinho no país não é obtida de videiras europeias (*Vitis vinífera* L.) como ocorre em praticamente todos os países produtores, mas sim de uvas americanas (*Vitis labrusca* L.) e híbridas. O consumo de vinhos obtidos da *Vitis vinífera* é cada vez mais dependente das

importações. Enquanto o consumo nacional per capita de uvas de mesa é crescente, o de vinho manteve-se estável, seguindo a tendência mundial (BRASIL, 2004).

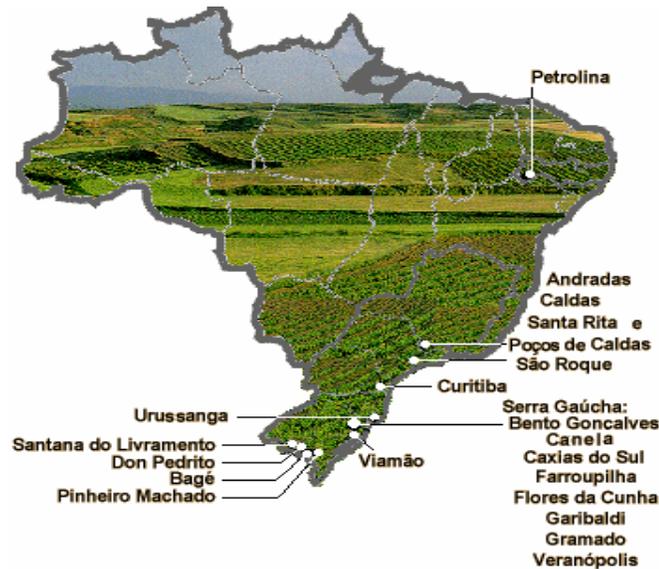


Figura 3 – Mapa do Brasil representando a maior concentração na produção de uvas para elaboração de vinhos e sucos e uva de mesa.

2.2.1 Viticultura no Norte do Paraná

No Paraná, a viticultura está em plena expansão, principalmente, na região Norte do Estado. A maior parte é de uvas finas de mesa, além disso, esta região possui em particular safras anuais, pelo clima atual e o uso da ciamida hidrogenada (ROBERTO; GENTA, 2007). A videira necessita de dois tipos básicos de adubação: a de correção (para corrigir a fertilidade do solo e repor os nutrientes absorvidos pela planta durante o ano) e a de manutenção ou de produção. A adubação orgânica pode ser utilizada, pois favorece tanto as características químicas, quanto às físicas e biológicas do solo, além de reduzir a quantidade de fertilizantes químicos.

Em relação aos aspectos econômicos, com o excesso de produção de uvas de mesa, houve queda do valor comercial do produto. A irrigação do vinhedo é fundamental para o aumento da produção. São recomendados

métodos de irrigação localizada, tais como o gotejamento à microaspersão, que permitem a aplicação controlada de água e nutrientes com menor risco de problemas fitossanitários, além de poderem ser automatizados. A falta de água durante a fase de formação e crescimento dos cachos e das bagas afeta diretamente a produção dos frutos.

2.3 INFLUÊNCIA DOS FATORES CLIMÁTICOS NA PRODUÇÃO DE UVAS

2.3.1 Temperatura

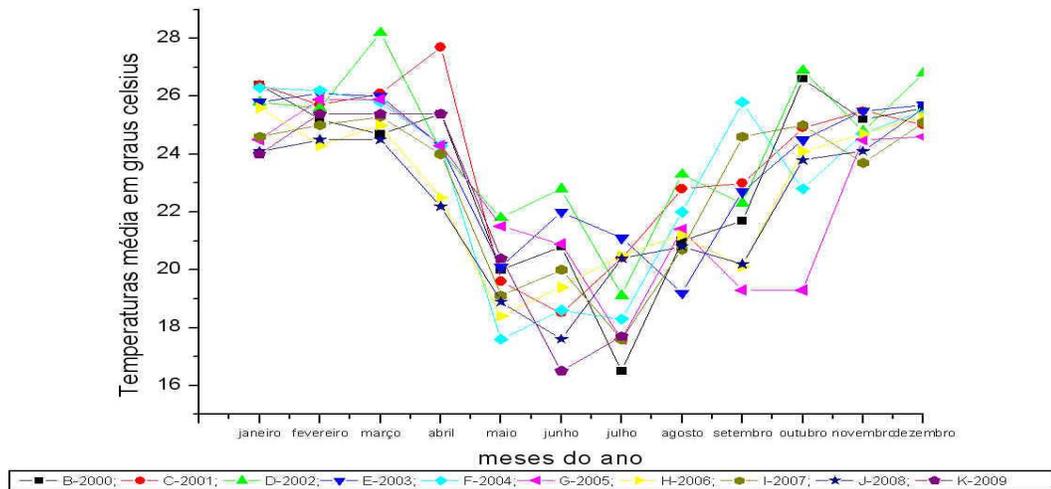
O clima particular é responsável por uma série de fenômeno metabólico que por sua vez responde pela diferenciação dos vinhos, principalmente no que se refere à composição fenólica das uvas e consequentemente dos vinhos. As variações hormonais nas plantas, durante o ciclo vegetativo, induzem o início ou término das diferentes fases do desenvolvimento, e estas regem a produção e a armazenagem dos diversos compostos químicos presentes nos vinhos. As baixas temperaturas noturnas determinam a parada de crescimento vegetativo e o início da maturação com acúmulos de açúcar e de substâncias fenólicas.

A videira é bastante resistente às baixas temperaturas na estação de inverno, período de repouso vegetativo. As cultivares americanas e híbridas são mais resistentes ao frio que as cultivares *Vitis viníferas*, podendo resistir à temperaturas entre -20 e -30°C. Essas temperaturas não ocorrem nas atuais regiões vinícolas brasileiras. O frio de inverno é importante para a quebra das dormências das gemas, no sentido de assegurar a brotação adequada para a videira. Segundo o zoneamento climático para o Estado do Rio Grande do Sul (1994), a cultivar americana necessita de mais de 100h de frio (abaixo de 7°C), para considerar boa quebra de dormência. Exemplificando, em Bento Gonçalves-RS, localizada na região vinícola da Serra Gaúcha, apresenta, de maio a agosto, um total médio de 358h de frio abaixo de 7°C, não apresentando, portanto qualquer restrição ao cultivo de uvas americanas em relação às exigências de frio, invernal. Em casos com pouco frio pode ocorrer menor índice de quebra de dormência das gemas da videira.

De forma genérica, considera-se a temperatura de 10°C como mínima para que haja desenvolvimento vegetativo. As geadas da primavera podem causar a destruição dos órgãos herbáceos da planta. A partir do período de brotação da videira, ela é sensível de -1,1°C. Assim, regiões com elevado risco de geadas, durante o período vegetativo da videira, devem ser evitadas. O plantio de cultivares de brotação tardia em locais de riscos baixos a moderados de geadas é prática coerente nas viticulturas. Contudo, as videiras americanas, quando danificadas por geadas tardias no início da brotação, podem apresentar brotação das gemas dormente da base dos ramos, que são gemas férteis, o que pode assegurar uma colheita, ainda rentável, mesmo que inferior à normal. Os danos por geadas dependem da intensidade do frio, época de ocorrência e de estágio fonológico da planta.

Condições térmicas muitas quentes podem resultar na obtenção de uvas com maiores teores de açúcares, menor acidez e, nas cultivares tintas, menor intensidade de cor. A Tabela 1A do Apêndice apresenta a soma térmica média necessária à maturação de diferentes cultivares de uvas americanas e híbridas destinadas à agroindústria. Os dados são da região Norte do Paraná e podem servir como indicativos aproximados para outras regiões Norte do Paraná. Para estimar a data da colheita da uva de uma determinada cultivar, deve-se fazer o somatório das temperaturas médias do ar superiores a 10°C, subtraída da temperatura basal de 10°C, dia-a-dia, a partir da brotação da videira até atingir a soma térmica para a cultivar em questão. O resultado da soma térmica é expresso em graus-dia.

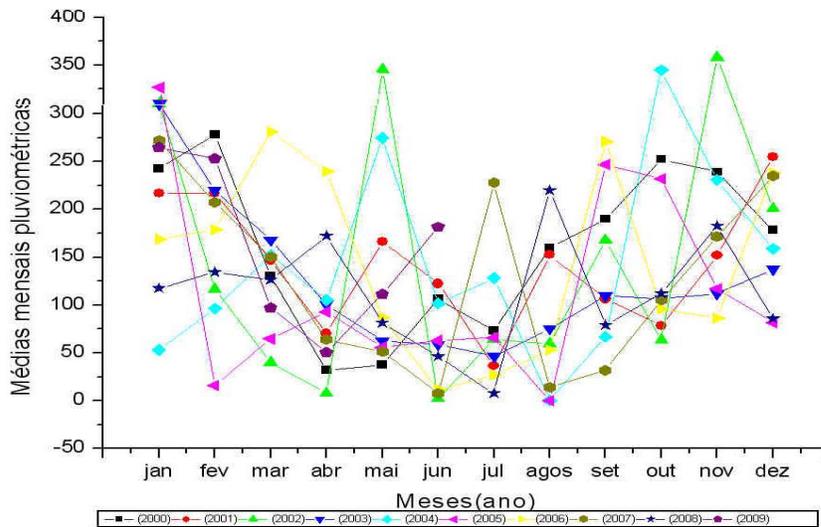
Elas afetam o comprimento do ciclo vegetativo da videira, o que é importante para a maturação dos ramos e a acumulação de reservas pela planta. A ocorrência de geadas no outono acelera a queda das folhas e o fim do ciclo vegetativo da planta. A Figura 4 mostra as temperaturas médias nos últimos dez anos.



Figuras 4 – Médias mensais das temperaturas nos últimos dez anos da região de Maringá-PR.

2.3.2 Precipitação

A precipitação pluviométrica é um dos elementos climático mais importante da viticultura (Apêndice A, Tabela 2A). A videira é uma cultura bastante resistente à seca. Influenciando na quantidade total de chuvas, mas também sua distribuição ao longo do ciclo vegetativo. A chuva de inverno tem pouca influência sobre as nossas videiras. É importante que os solos apresentem disponibilidade hídrica adequada no período da brotação das plantas. Durante a primavera, as chuvas são importantes para o desenvolvimento da planta, já o excesso de chuva pode favorecer o desenvolvimento de algumas doenças fúngicas da parte aérea, bem como afetar fases importantes da videira, como a floração e a frutificação, causando baixo vingamento de frutos. A Figura 5 representa as médias mensais pluviométricas nos últimos dez anos na região de Maringá-PR.



Figuras 5 – Médias mensais pluviométricas nos últimos dez anos da região de Maringá-PR.

2.4 FONTES DE ANTOCIANINAS

Existem mais de 400 antocianinas diferentes (KONG, 2003). As antocianinas encontram-se distribuídas em numerosas famílias de plantas: *Vitaceae* (uva), *Rosaceae* (cereja, ameixa, framboesa, morango, amora, maçã, pêssigo), *Solanaceae* (tamarindo, batata), *Saxifragaceae* (groselha preta e vermelha), *Ericaceae* (mirtilo, oxicoço), *Cruciferae* (repolho roxo, rabanete), *Leguminoseae* (vagem) e *Gramineae* (sementes de cereais). A contribuição das cores de flores e frutos, as antocianinas atuam como filtro das radiações ultravioletas nas folhas. Em certas espécies de plantas estão associadas com a resistência aos patógenos e atuam melhorando e regulando a fotossíntese. As cores intensas dos frutos indicam a presença de fotoquímicos compostos bioativos, como os carotenoides e as antocianinas, que contribuem para a preservação da saúde (FRANCIS, 2000).

Além do atrativo da coloração, as antocianinas apresentam capacidade antioxidante, que estão protegidas nos tecidos das plantas. Quando as frutas e os outros vegetais são cortados, ocorre exposição dos carotenoides ao oxigênio em contato com as enzimas oxidativas, principal razão para a

degradação. Fatores como exposição de luz, disponibilidade de água e presença de antioxidantes, podem influenciar este processo.

Os compostos fenólicos flavonoides (que englobam antocianinas e flavonóis), os ácidos fenólicos (derivados de ácidos cinâmico e benzoico, os estilbenos e resveratrol) e grande variedade de taninos, eram apresentados como tendo efeito adverso ao metabolismo humano. (FRANCIS, 2000).

2.5 ESTRUTURA QUÍMICA DAS ANTOCIANINAS

As antocianinas significam = do grego *anthos*, flor e *kianos*, azul; são pigmentos vegetais responsáveis pelas cores azul, roxo e todas as tonalidades do vermelho encontradas em flores e frutos e folhas, caules de plantas (MARÇO; POPPI; SCARMÍNIO, 2008). A Tabela 1 mostra a classe de antocianinas.

Tabela 1 – Antocianinas mais frequentemente encontradas nos alimentos

Antocianinas	Fonte
Cianidina-3-glicosídeo	Uva, vinho, cereja, jambolão
Cianidina-3,5-diglicosídeo	Uva, vinho, cereja, figo, marmelo
Peonidina-3-glicosídeo	Uva, vinho, cereja, jaboticaba
Malvidina-3-glicosídeo	Uva, vinho
Malvidina-3,5-diglicosídeo	Uva, vinho, feijão, inhame
Cianidina-3-galactosídeo	Maçã, cacau
Cianidina-3- <i>p</i> -cumarilsoforosídeo-5-glicosídeo	Repolho roxo
Pelargonidina-3-soforosídeo-5-glicosídeo	Rabanete
Pelargonidina-3-glicosídeo	Morango, tamarindo
Delfinidina-3,5-diglicosídeo	Berinjela, feijão, uva, romã
Delfinidina-3-cafeoilglicosídeo-5-glicosídeo	Berinjela
Petunidina-3-glicosídeo	Uva, vinho, feijão, mirtilo, laranja

Fonte: Francis (2000).

As antocianinas fazem parte do grupo dos flavonoides, que são compostos fenólicos caracterizados pelo núcleo básico flavílio (cátion 2-fenilbenzopirílio) que têm dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos e condensados por um oxigênio. São compostos solúveis em água e altamente instáveis em temperaturas elevadas. O composto de antocianina (Figura 6) é constituído por duas ou três moléculas; antocianidina, grupo de açúcares e um grupo de ácidos orgânicos (FRANCIS, 2000). Aproximadamente, 22 agliconas são conhecidas das quais apenas seis

(Cianidina, Delfinidina, Pelargonidina, Peonidina, Petunidina e Malvidina) são as mais importantes nos alimentos (FRANCIS, 2000). As antocianinas estão presentes praticamente em flores e frutos, com sua coloração azul uma Cianidina, vermelho uma Delfinidina e violeta uma Peonidina.

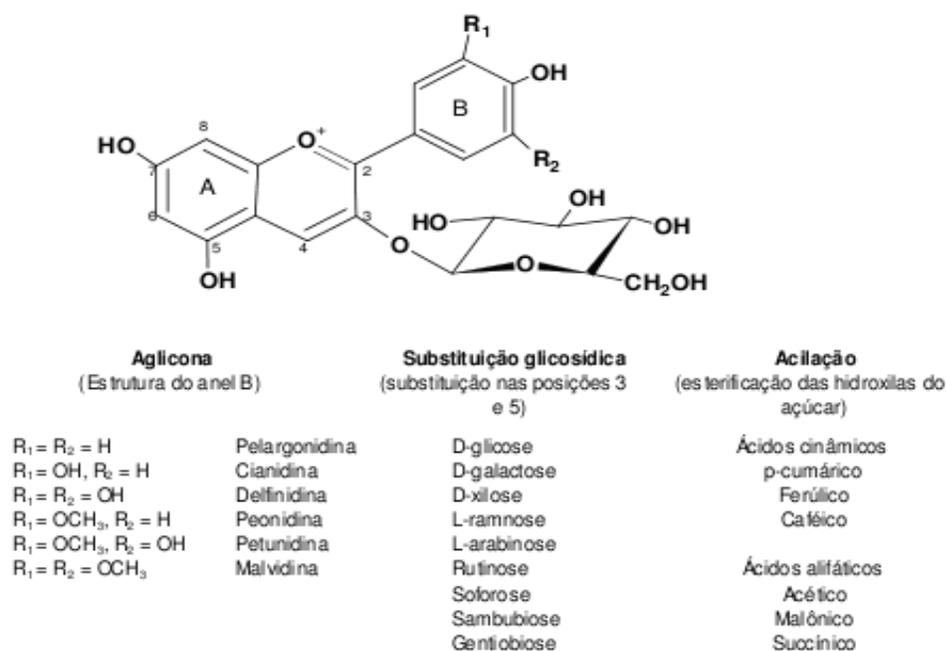


Figura 6 – Estrutura química das antocianinas com suas substituições estruturais.

Fonte: Francis (2000).

Antocianinas livres são raramente encontradas em planta, ocorrendo com os açúcares glicosilados que estabilizam a molécula (FRANCIS, 2000). A frequência da glicosilação ocorre na posição 3. O segundo ocorre na posição 5, mas pode ocorrer também na posição 7, 3', 4' e 5'. Glicose, arabinose, xilose, ramnose, galactose ou dissacarídeos constituídos por esses açúcares, frutose são os açúcares mais comuns ligados a antocianidina, ocorrendo monoglicosídios, diglicosídios e triglicosídios glicosilados na forma de aglicona (FRANCIS, 2000).

A antocianina se dá pela diferença nos grupos hidroxila na molécula, grau de metilação, natureza, número de exposição da glicosilação, natureza e número de grupos aromáticos ou ácidos alifáticos ligados ao resíduo da

glicose. A estrutura das moléculas (Figura 6) tem efeito profundo na intensidade da cor e na estabilidade durante o processamento. Em geral, o aumento da hidroxilação diminui a estabilidade e o aumento da metilação contribui para a estabilidade da molécula (ARTHEY; ASHURST, 2001).

Os açúcares das antocianinas são acilados por ácidos p-cumárico, ferúlico, cafeico, p-hidroxibenzoico, sinápico, malônico, acético, succínico e málico (FRANCIS, 2000). Os substituintes acila encontram-se usualmente ligados à hidroxila do açúcar na posição 3 e com menor frequência nas posições 4 e 6. A metoxilação é mais frequente nas posições 3' e 5' e menos comum em 5 e 7. Salientamos que a antocianina natural nunca apresenta as hidroxilas das posições 5, 7 e 4' substituídas ao mesmo tempo. Um dos grupos da hidroxila deve permanecer livre numa dessas posições para a formação da estrutura quinoidal, responsável pela cor.

As antocianinas também podem ser degradadas por enzimas endógenas presentes nos tecidos das plantas, tais como glicosidases, polifenóis oxidases e peroxidases. As glicosidases, também denominadas antocianases, hidrolisam as ligações glicosídicas e com liberação do açúcar e da aglicona.

Nas antocianinas, verifica-se sempre a existência de um resíduo de açúcar na posição 1 e, ocasionalmente, uma glicose na posição 3 ou, mais raramente, nas posições 8, 13 e 15. Os açúcares que muito, usualmente, se encontram ligados a antocianinas são, para além da já referida glicose, a galactose, a ramnose e a arabinose. Os grupos R1 e R2 variam (Figura 7), verificando-se que os grupos R3 e R4 são frequentemente hidroxilas ou glicosilos (usualmente glicosídeo).

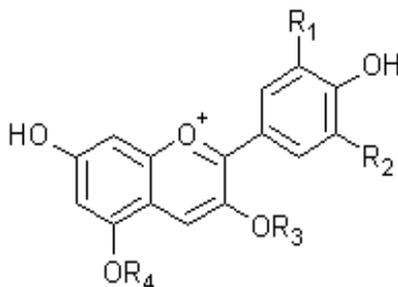


Figura 7 – Estrutura básica de uma antocianina.
Fonte: Março, Poppi e Scarmínio (2008).

Na natureza, as antocianinas ocorrem sob a forma de monoglicosídeo (glicose ligada na posição 3) ou diglicosídeo (glicose nas posições 1 e 3). Na couve roxa existe essencialmente diglicosídeo da cianidina e na casca da maçã encontra-se, essencialmente, monoglicosídeo da mesma e nos morangos encontra-se a pelargonidina monoglicosiladas.

A possibilidade de ocorrência de várias protonações e desprotonações na estrutura das antocianinas faz com que ocorram diversas interações com o sistema de orbitais das mesmas e estas sofrem variações de cor com o pH, do meio em que se encontram (Figura 8). O fato de possuírem também um grande conjunto de orbitais livres tornam-se ótimos antioxidantes.

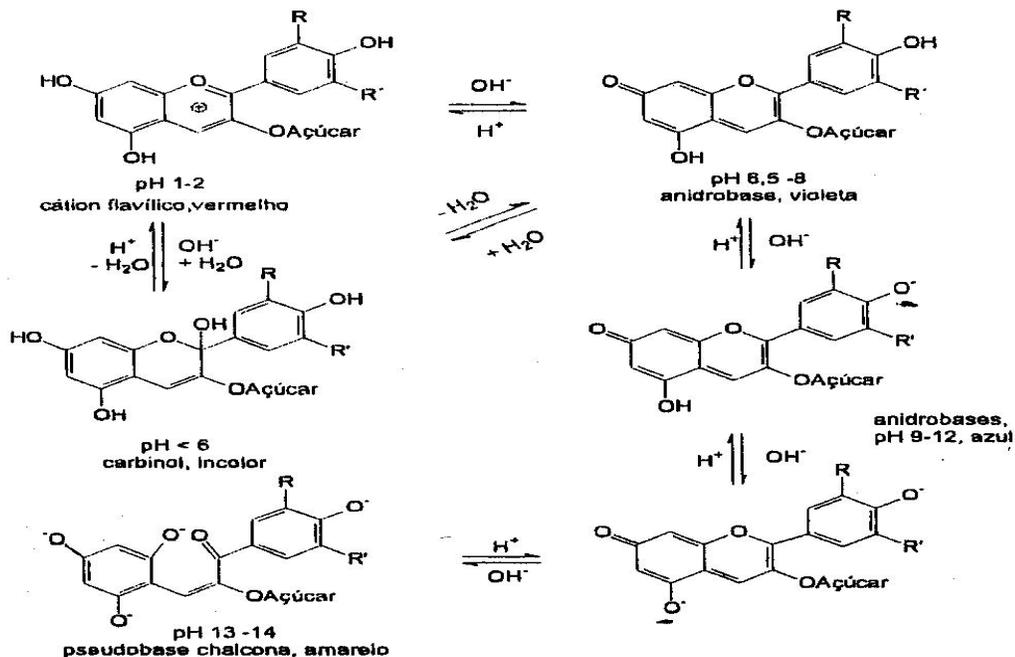


Figura 8 – Possíveis transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH.
Fonte: Campos (2005).

2.6 EFEITO DA DEGRADAÇÃO DAS ANTOCIANINAS

O aquecimento é um fator que acelera a degradação das antocianinas. Em presença de cátions de Al, Fe, Sn e outros metais, as antocianinas formam

produtos insolúveis que, no caso do alumínio, encontram aplicações como corantes que apresentam estabilidade ao calor, pH e oxigênio superior à das antocianinas livres. Além do pH, a luz é um outro fator de grande importância na alteração da cor das antocianinas. A transformação é mais intensa quando o fator luz é combinado com o efeito do oxigênio. As antocianinas também podem se combinar com HSO_3^- presente em muitos alimentos, formando produtos incolores provenientes da ligação deste com o carbono 4 da antocianina. A estabilidade das antocianinas ao descolorimento é aumentada consideravelmente pela presença de ácidos fenólicos. O mesmo efeito é observado pela presença de flavonoides não-antociânicos, especialmente os flavonóis, como por exemplo, a rutina. Compostos como o acetaldeído, aminoácidos, taninos, dentre alguns outros, também conferem aumento na estabilidade da molécula. Esse aumento na estabilidade é atribuído à copigmentação, ou seja, associação entre antocianina e flavonol (copigmento) por ligações de hidrogênio, de modo que o flavonol venha a formar uma estrutura protetora envolvendo a antocianina.

2.6.1 Efeito da temperatura

As videiras cultivadas em áreas montanhosas, onde a radiação UV é maior, podem sintetizar maiores quantidades de resveratrol. A irradiação pela luz UV parece estar associada com o aumento na concentração da enzima responsável pela biossíntese dos flavonoides. Estes protegem o material genético das plantas contra danos provocados pelos raios ultravioletas.

O cultivo de uvas a baixas altitudes parece desfavorecer a biossíntese de antocianinas monoglicosiladas nas cascas de uvas, se comparado com as que são cultivadas em altitudes maiores. Em algumas variedades, temperaturas acima de 35°C diminuem fortemente o acúmulo de antocianinas e a falta ou excesso de umidade tende a diminuir seu conteúdo (MATEUS et al., 2001).

Mecanismo de degradação das antocianinas pelo calor ocorre provavelmente pela abertura do anel do cátion flavilium e sua conversão à chalcona, que é incolor. Essa degradação é irreversível e confere a formação do produto de coloração marrom. Normalmente, o aumento da temperatura

causa aumento logarítmico na destruição das antocianinas, isto pode ocorrer durante o armazenamento e estocagem dos alimentos, mas nem sempre isso acontece. É possível que para algumas antocianinas o aumento na temperatura favoreça a produção de complexos ou reações de polimerização durante a degradação que estabilizam os pigmentos. As antocianinas de uvas *Vitis labrusca* (var. "Concord") em diferentes sistemas e modelos, com e sem adição de açúcar, verificou que a degradação das antocianinas é maior com aumento de temperatura.

O efeito de diferentes temperaturas sobre a estabilidade de antocianinas do extrato bruto de laranjas pigmentadas foi estudado por Katsaboxakis, Papanicolaou e Melanitou (1998) em pH 3,5. Após 3h em temperaturas de 60, 70 e 80°C, verificou-se perda de menos de 20% das antocianinas, enquanto que quando mantidas a 90 e 100°C, mais de 50% das antocianinas foram destruídas.

2.6.2 Efeito da oxigenação

O elemento químico oxigênio pode atuar como substância tóxica originada por meio de processos que desencadeiam a formação de radicais livres, compostos instáveis e altamente reativos que contém elétron desemparelhado. Os radicais livres, altamente instáveis, reagem com moléculas estáveis, com o objetivo de capturar elétrons, transformando-as em um novo radical livre (KAUR; KAPOOR, 2001). Podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação. Sua formação "in vivo" ocorre durante os processos de transferência de elétrons, durante o metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos, como radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta e cigarro.

Em 1936, Tressler e Pedersen, primeiramente, observaram diferença na cor do suco de uva, conforme a demora no engarrafamento. Atualmente, é sabido que o oxigênio pode degradar antocianinas pelo mecanismo de oxidação direta ou indireta, oxidando os constituintes do meio que reagem com as antocianinas. Por esta reação, relatos da descoloração de antocianinas pelo ataque direto do ácido ascórbico foram desconsiderados, visto que a destruição

é medida pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂), produzido pela oxidação aeróbica do ácido ascórbico na presença de íons de cobre.

2.6.3 Efeito do pH

A cor e a estabilidade de uma antocianina dependem largamente do pH do meio em que esta se encontra (Figura 9). A maior estabilidade é obtida a valores mais baixos de pH e vai perdendo com aumento do pH. Quando o valor de pH está próximo de 4,0, verifica-se a formação de uma coloração azulada (passando pelo roxo) que passados alguns instantes acaba por desaparecer. Este fato deve-se a um duplo equilíbrio em que há formação de dois produtos, um cinético (transferência de próton), outro termodinâmico (reação de hidratação), no primeiro apresenta coloração azul e o segundo é incolor. Com o aumento do pH, verifica-se que ocorre a abertura do anel principal da antocianina e a solução adquire um caráter amarelo pálido, passando pelo verde, dando origem a dois isômeros de um mesmo produto.

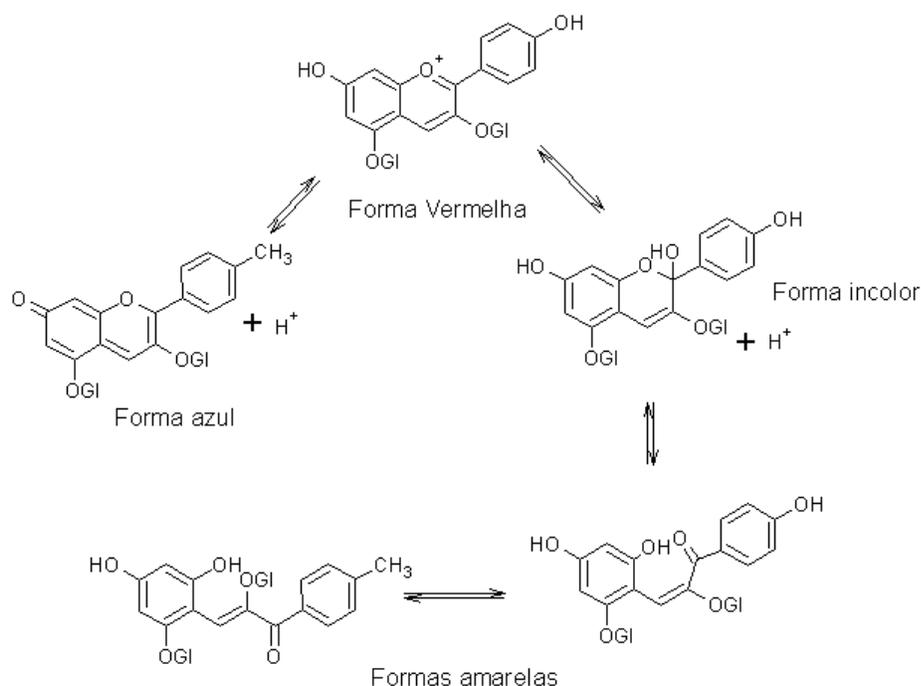


Figura 9 – Fontes de antocianinas nas diversas formas de cores encontradas na natureza.

Fonte: Francis (2000).

As antocianinas encontram-se numa estrutura quinoidal estável, quando o pH se encontra na faixa de 3,0 a 6,0, valores comuns em sucos de frutas. Em meio aquoso, as antocianinas formam complexos com numerosos compostos tais como proteínas, taninos, flavonoides não-antociânicos e ácidos orgânicos, ácidos nucleicos, alcaloides, polissacarídeos e íons metálicos por meio da copigmentação intermolecular.

O pH baixo é uma das características da principal cultivar da *Vitis labrusca*. O pH influencia diretamente na estabilidade das antocianinas. Portanto, os conhecimentos dessas características para cada combinação copa/porta-enxerto é extremamente importante quando se desejar obter altos teores de matéria corante (MALACRIDA; MOTTA, 2006).

2.6.4 Solubilidade das antocianinas

As antocianinas são solúveis em água e alcoóis, insolúveis em solventes apolares orgânicos e instáveis em meio neutro ou alcalino. Geralmente, são extraídas a álcool (de preferência etanol, se for destinado para uso medicinal ou alimentício), na presença de ácido clorídrico em baixa concentração (0,1 a 1%). Também pode ser empregado um ácido fraco (acético, tartárico ou cítrico), quando se quer evitar a desacetilação ou esterificação do pigmento. Soluções de antocianinas são bastante instáveis, e devem ser mantidas sob atmosfera de nitrogênio, no escuro e à baixa temperatura. Antocianinas são sensíveis ao oxigênio, ao calor, à luz e são susceptíveis a ataques nucleofílicos (Figura 10).

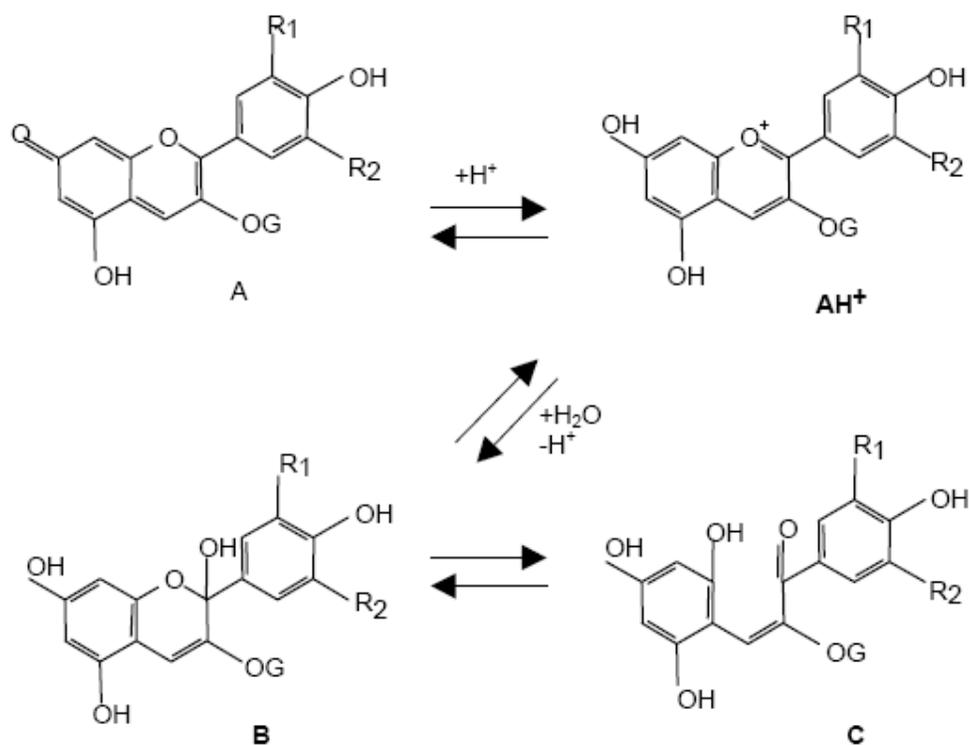
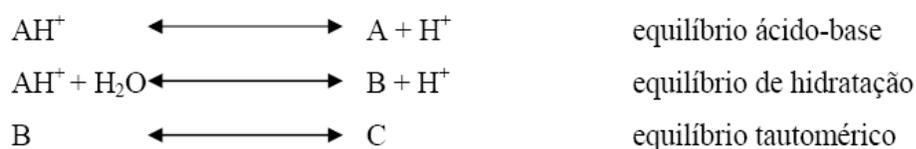


Figura 10 – Reações em equilíbrio em relação à temperatura.
 Fonte: Francis (2000).

A interconversão entre estas estruturas é dada pelo esquema seguinte:



Estas reações são endotérmicas e por isso os equilíbrios são funções da temperatura

2.6.5 Efeito da luz

O mecanismo de degradação fotoquímica das antocianinas não é completamente compreendido e o conhecimento da estabilidade das antocianinas à luz é limitada (PROVENZI et al., 2006) e comparando o efeito da presença e da ausência de luz sobre a estabilidade de antocianinas de uvas

Vitis vinífera (Var. Grenache noir) e verificaram que a presença de luz implica em perdas significativas na cor das antocianinas. Entretanto, Morais et al., 2002 estudaram o efeito da luz sobre a estabilidade de peonidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo extraídas de cascas de uvas *Vitis vinífera* (Var. “Red globe”) e verificaram também que a presença e a ausência de luz não exerceram efeito significativo sobre a decomposição das antocianinas. Normalmente, as antocianinas apresentam-se instáveis quando são expostas à luz visível ou raios (PROVENZI et al., 2006)

2.7 BIOSÍNTESE DAS ANTOCIANINAS

Os compostos fenólicos têm importantes funções na planta, atraem animais para polinização ou dispersão de sementes; são importantes para proteger as plantas contra os raios UV, os insetos, os fungos, os vírus e as bactérias. Acredita-se também que as ligninas tenham sido fundamentais para o desenvolvimento do sistema vascular vegetal, dando rigidez aos vasos. Esses compostos são sintetizados, a partir da via do ácido chiquímico (principal) e a via do ácido mevalônico, menos significativa. O ácido chiquímico é formado pela condensação de dois metabólicos da glicose, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato. No próximo passo, o ácido chiquímico e o fosfoenolpiruvato se une formando ácido corísmico que por sua vez gera os aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina) que são precursores de vários alcaloides. Um dos primeiros grupos de compostos fenólicos, formados a partir do ácido corísmico, é o fenilpropanoide, também precursor da lignina (que é na verdade um polímero altamente ramificado de fenilpropanos). A via do ácido chiquímico é presente em plantas, em fungos e bactérias, e sua principal enzima é a fenilalanina amônio liase (PAL). Essa enzima retira uma amônia da fenilalanina formando o ácido cinâmico. A PAL é regulada por fatores ambientais como o nível nutricional, a luz (pelo efeito do fitocromo) e por infecção por fungos. Os flavonoides representam importante classe de compostos derivados da PAL, de importância muito grande nas angiospermas, principalmente na sinalização entre plantas e outros organismos e na proteção contra UV. Entre os compostos que as plantas utilizam para colorir suas flores é a antocianina, de 21 classes de flavonoides. As antocianinas são glicosídeos

de flavonoides. A aglicona (molécula sem o açúcar) é conhecida como antocianidina. As antocianinas são bastante solúveis e se acumulam nos vacúolos das células das pétalas. Elas são transportadas para os vacúolos por intermédio de glutatona-S-transferase (GST) e os transportadores ABC (Figura 11).

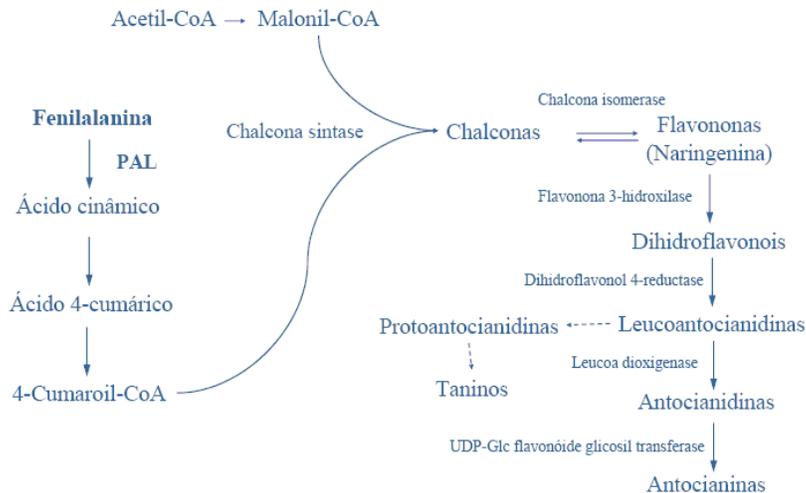


Figura 11 – Biossíntese das antocianinas.
Fonte: Domingos (2004).

Algumas espécies vegetais sofreram mutação na enzima (CHS) o que dá origem à acumulação de estilbenos, uma classe de compostos relacionados aos flavonoides. (um estilbeno de grande importância é o resveratrol). A enzima CHS é necessária para que haja formação de antocianinas, flavonóis, taninos condensados e os isoflavonoides. Os flavonóis são os próprios precursores de antocianinas e dos taninos condensados, contudo, por si só absorvem a radiação UV (280-320 nm) para proteção das plantas. Um conhecido exemplo de flavonol é a quercetina. Os isoflavonoides são também conhecidos como fitoalexinas, uma classe de compostos com ação antipatógenos ou inseticida.

Os taninos condensados são compostos fenólicos solúveis em água com massa molecular entre 500 a 3.000 Daltons. Esses compostos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos. Os taninos atuam na defesa

contra pragas, pois se ligam a proteínas digestivas dos insetos. Esses compostos também são denominados protoantocianidinas pelo fato de produzirem pigmentos avermelhados (antocianidinas) após degradação.

2.8 COMPOSTOS FENÓLICOS

As características das plantas são a capacidade de sintetizar uma grande diversidade de compostos de baixo peso molecular, denominados de metabólicos secundários que são essenciais ao metabolismo vegetal.

Os compostos secundários são substâncias que não fazem parte do metabolismo básico das plantas e possuem características químicas diferente, bastante complexas.

Os compostos secundários possuem um grupo muito forte de fotoquímicos, derivados da fenilalamina e tirosina; englobam moléculas muito simples até alto grau de polimerização; estão ligados nas formas livres como açúcares (glicosídios) e proteínas, sendo essenciais para o crescimento e reprodução das mesmas. Esses compostos se formam na forma de estresse, como infecções, ferimentos, radiações UV dentre outras.

Historicamente foi considerado como antinutricionais, porque alguns taninos tinham efeito adverso ao metabolismo. Hoje, tem-se uma visão diferente quanto aos benefícios para a saúde, que esses compostos podem apresentar.

2.9 RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES

Os radicais livres são classificados como moléculas orgânicas, inorgânicas ou átomos, que contêm um ou mais elétrons não-pareados, tendo estas moléculas existência independente (BOYCE, 1999). Esse tipo de estrutura faz com que os radicais livres sejam moléculas de alta instabilidade, tendo meia vida curta e sendo muito reativo. Levando-se em consideração a manutenção de muitas das funções fisiológicas normais, a presença dos radicais livres é crítica.

Estas espécies promovem oxidação prejudicial que pode danificar membranas e conteúdos celulares. As LDLs (lipoproteínas de baixa densidade)

são partículas formadas por lipídios, colesterol e proteínas em geral, que podem se oxidar por ação dos radicais livres. Em um fenômeno em série, consequentemente, podem afetar as moléculas do colesterol e dos ácidos graxos que compõem cada LDL. Radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias e nas membranas, e no alvo celular (proteínas lipídeos, carboidratos e DNA). São, geralmente, menos estáveis do que os compostos não-radicaís, embora suas reatividades variem. Apesar de os seres humanos dependerem da oxidação biológica como fonte de energia para a sobrevivência e atividade, a ação do oxigênio é ambígua. A reatividade poderosa das espécies reativas do oxigênio (EROs), tais como o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical (OH^\bullet), podem causar danos funcionais ao homem.

2.10 COPIGMENTAÇÃO

Os ácidos fenólicos da série cinâmica encontram-se na uva, combinados com os ácidos tartárico na forma de monoésteres. Na Figura 12 encontra-se representado o ácido cinâmico, do qual derivam os ácidos fenólicos desta série, e os ácidos cinâmicos mais importantes: o ácido ferúlico, o ácido p-cumárico e o ácido cafeico.

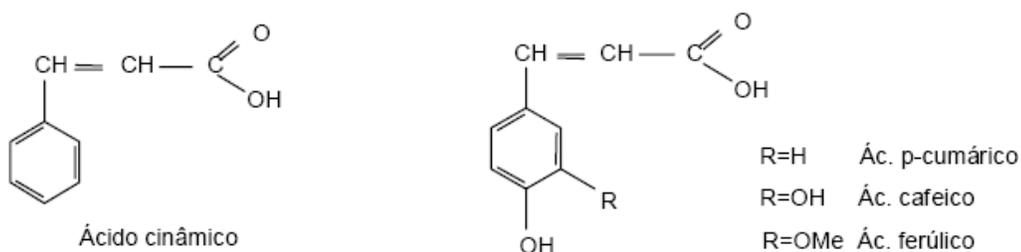


Figura 12 – Estrutura mais importante dos ácidos cinâmicos.
 Fonte: Balasundram, Sundram e Samman (2006).

Se considerarmos a coloração das antocianinas apenas em função de pH, somos levados a crer que as plantas, ou parte delas, não deveriam ser coloridas, uma vez que, na maioria dos casos, o pH natural dos vegetais se

encontra na faixa ligeiramente ácida para neutra. Nesta região de pH, a maioria das antocianinas se encontra na forma não-colorida. Entretanto, o que se observa é que as antocianinas se encontram sempre associadas às partes coloridas das plantas, indicando que estas antocianinas devem estar estabilizadas por fatores físico-químicos incomuns. A presença de compostos denominados de copigmento pode ser um destes fatores. Os flavonoides não-antociânicos, alcaloides, aminoácidos e nucleosídios, entre outros, podem atuar como copigmento e a própria antocianina pode agir copigmentada a outra antocianina. Podem existir três mecanismos básicos de estabilização de antocianinas, com, ou sem, copigmentação intramolecular, copigmentação intermolecular e autoassociação com o envolvimento de moléculas de antocianidinas, de flavonoides ou ácidos aromáticos e de açúcares. Quando a concentração de antocianinas é relativamente alta, as antocianinas podem atuar como copigmento entre si mesmo. As soluções de antocianinas muito diluídas apresentam intensificação no aumento da coloração, quando copigmentadas com rutina, mas este aumento na absorbância é paulatinamente reduzido à medida que se aumenta a concentração da antocianina. A menor disponibilidade de antocianina para a copigmentação com a rutina, pode ser atribuída à estabilização do cátion flavilium por meio da autoassociação das antocianinas, quando presentes em concentrações mais elevadas.

2.10.1 Copigmentação intramolecular

A copigmentação intramolecular é possivelmente responsável pela extraordinária estabilidade dos cromóforos das antocianinas poliaciladas. Os resíduos aromáticos de grupos acila se alinham com o anel pirilium do cátion flavílio, dificultando a adição da água em C-2 e C-4 do anel. Com dificuldade para a hidratação, a molécula e as reações de transferência de prótons se dá pelo processo de empilhamento. Provavelmente, essas forças que atuam no processo de empilhamento sejam forças hidrofóbicas. A copigmentação intramolecular somente ocorre quando o pigmento e o copigmento são partes de uma única molécula, ou seja, quando o cromóforo da antocianina e um resíduo de ácido cinâmico (copigmento) estão covalentemente ligados ao

mesmo resíduo de açúcar. A copigmentação intramolecular é mais eficiente na estabilização das antocianinas que a copigmentação intermolecular, pois, sob o ponto de vista termodinâmico, o efeito intramolecular tem vantagem entrópica sobre o efeito intermolecular, necessária às moléculas separadas inicialmente em solução. A estabilidade da cor de moléculas aciladas é causada por um fenômeno de copigmentação intramolecular, no qual os resíduos aromáticos dobram-se e interagem-se com o sistema do núcleo pirilium, protegendo as formas coloridas contra o ataque nucleofílico da água.

2.10.2 Copigmentação Intermolecular

A copigmentação intermolecular além do aumento da absorção na região do visível, também pode causar um deslocamento batocrômico no comprimento de onda de máxima absorção. A complexação é, provavelmente, dominada por forças de Van der Waals e efeitos hidrofóbicos em meio aquoso, resultados do empilhamento p-p entre a molécula de antocianina e copigmentação. A reação de copigmentação é, provavelmente, o principal mecanismo de interação molecular envolvido em variações da cor e da adstringência durante a produção e envelhecimento dos vinhos. O aumento da estabilidade ocorre porque o pigmento compete com a água e interage com as antocianinas, complexando com formas coloridas e modificando a natureza do pigmento. Aumento nos valores de absorbância (efeito hiperacrômico), bem como o deslocamento batocrômico, geralmente entre 5 e 20 nm ou mais, no comprimento de onda de máxima absorção (BOULTON, 2001) é conferido a certos pigmentos, o que confere a tonalidade azul-púrpura às soluções vermelhas das antocianinas (BOULTON, 2001) e satisfatoriamente reflete na estabilidade do complexo formado. O efeito hiperacrômico não ocorre pelo aumento no coeficiente de absorção, mas a um aumento da concentração de moléculas coloridas; e o efeito batocrômico pode ser explicado por uma redução local na polaridade do cromóforo flavilium causado pelo envolvimento deste com o copigmento por associações hidrofóbicas. O complexo pigmento-copigmento formado é dependente da concentração de ambos à medida que aumenta a relação copigmento/antocianina, aumenta a absorbância da amostra e o deslocamento batocrômico no comprimento de onda de máxima absorção.

A presença de etanol diminui o efeito da copigmentação de antocianinas. Em um estudo realizado com extratos de morango e chokeberry adicionados de ácido clorogênico, verificou-se que 5% de etanol utilizado como um cossolvente diminui o efeito da interação do ácido com os pigmentos antocianínicos. Em pH 3,4, a presença de etanol (10%) resultou na diminuição de 20-25% nos valores de absorvância de soluções de antocianinas, porque nas bebidas alcoólicas que contêm antocianinas, a copigmentação terá pouco efeito sobre a cor.

O extrato bruto de antocianinas de Jambolão (*Eugenia jambolona* Lamarck) foi avaliado por Marques, Fett e Brighette (2001), que analisaram a influência do ácido tânico e gálico em diferentes proporções, em pH 2,0 soluções alcoólicas e aquosas. Os autores verificaram também que o aumento da temperatura, presença de luz e presença de álcool, influenciou significativamente na degradação das antocianinas e na adição de ácido salicílico e ácido gálico, em solução alcoólica e aquosa, respectivamente, conferiu aumento na capacidade na retenção de cor às antocianinas. Em experimentos com vinho tinto, Darías-Martins (2001) verificou o efeito da adição do ácido cafeico e catequina ao mosto do vinho na fase de pré-fermentação. Após 90 dias, o autor verificou que o ácido cafeico conferiu aumento de 60% nos valores de absorvância do vinho, enquanto que o vinho adicionado de catequina apresentou valores de absorvância inferiores às amostras-controle.

2.11 ANTOCIANINAS NO VINHO

A vinificação começa com o esmagamento das uvas, que expõe as partes sólidas da fruta ao seu próprio suco. A extração de fenólicos é mínima na manufatura de vinhos brancos, em que o contato do suco com as cascas, talos e sementes é justamente um fator indesejável e deve ser evitado. Os polifenóis são os principais responsáveis pela adstringência e amargor em vinhos brancos, e agem como substratos em processos de oxidação. Na produção de vinhos vermelhos, as cascas são deixadas, e esta diferença é responsável pelo maior teor de compostos fenólicos. Porém, o esmagamento

excessivo com grande desgaste das partes sólidas leva à extração de fenólicos adstringentes, prejudicando a qualidade do vinho.

O uso da antocianinas como corante tem grande relevância pelas suas propriedades e características antioxidantes (SILVA; MATIAS; NUNES, 2005), que levados em conta os corantes sintéticos podem ter efeito adverso à saúde e ao grande interesse por derivados de produtos naturais.

O potencial antioxidante das antocianinas poderem chegar a ser duas vezes maior, os antioxidante disponíveis comercialmente como (+) catequina e os outros compostos como a vitamina E (SEERAM et al., 2006), chegam a apresentar melhor atividade antioxidante que o butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT) (ESPÍN et al., 2000). As antocianinas têm habilidade para serem fortemente polares, podendo substituir os antioxidante nos meios lipofílicos como a vitamina E (RAMIREZ-TORTOZA et al., 2001). As atividades antioxidantes dos compostos fenólicos como os flavonoides, ácidos fenólicos e antocianinas, pela facilidade de doar elétrons, ou átomos de hidrogênio, ou que podem quelar os cátions metálicos, ou capturar radicais livres (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

As antocianinas são solúveis em água e alcoóis, insolúveis em solventes apolares orgânicos, e instáveis em meio neutro ou alcalino. Geralmente, são extraídas com diversos alcoóis (de preferência etanol, se for destinado para uso medicinal ou alimentício), na presença de ácido clorídrico em baixa concentração (0,1 a %).

2.12 ANTOCIANINAS PARA USO INDUSTRIAL

Os antioxidantes apresentam papel importante no sistema de defesa contra espécies reativas de oxigênio que podem ser originários de compostos naturalmente presentes em alimentos, ou formados durante o processamento (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000). Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. É um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres que pode ser empregado nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e na medicina. O uso na indústria farmacêutica e a comercialização de fitoterápicos se devem a relatos científicos que apontam o uso de antocianinas para controle

de pressão arterial, como agentes contra diabetes e a hipoglicemia. Outros efeitos terapêuticos já relatados incluem ação antiinflamatória e prevenção do colesterol e a redução de doenças coronárias e também propriedades antioxidantes.

Na prática médica, as aplicações terapêuticas das antocianinas se limitam ao tratamento de distúrbios vasculares. O mercado oferece extratos de drogas ricas em antocianinas para a preparação de formulações destinadas ao tratamento de sintomas ligados à fragilidade venosa e capilar.

É empregada também na indústria cosmética e na utilização em formulações, principalmente, na forma de extratos naturais. A atividade antioxidante das antocianinas pode influenciar no processo de peroxidação lipídica. Essa característica tende a se intensificar o interesse do ponto de vista cosmético.

A antocianina também está presente na indústria alimentícia e na utilização como corante natural em alimentos processados. O interesse no uso das antocianinas como corante alimentício pode estar relacionado com possíveis benefícios à saúde conferidos por esses pigmentos. As antocianinas podem ser utilizadas em substituição aos corantes sintéticos, pelo seu alto poder de coloração e sua relativa baixa toxicidade.

No uso industrial, as antocianinas ainda são restritas em função de algumas limitações, dentre as quais se destacam na disponibilidade da matéria-prima e purificação.

A quantidade e a composição das antocianinas presentes nas uvas diferem de acordo com as espécies, as variedades, as maturidades, as condições climáticas e a cultivar. O conteúdo de antocianinas em uvas tintas varia de 30 a 750 mg/100 g da fruta madura. Nas uvas de variedades híbridas se encontram antocianinas, sendo predominante a malvidina monodiglicosídeo e a malvidina diglicosídeo. As antocianinas de uvas da espécie *Vitis rotundifolia* (variedade Muscadínea) são 3,5-diglicosídeo de malvidina.

2.13 CARACTERIZAÇÃO DO SUBPRODUTO DA VINIFICAÇÃO

O Brasil, por ser um país de grande atividade agrícola, é um dos que mais produz resíduos agroindustriais e na busca de alternativa, para a

utilização de matéria orgânica gerada, vem crescendo em vários centros de pesquisas.

Produtores e indústrias da área, assim como o da vinícola, enfrentam problemas de descarte com o resíduo, que, embora seja degradável, necessita de um tempo mínimo para a mineralização, constituindo assim fonte de poluentes ambientais.

A tecnologia atual tornou possível maior aproveitamento dos produtos secundários da vinificação. São diversos produtos a se obter no processamento da uva, que podemos aproveitar. Para cada 100 L de vinho produzido são gerados 31,7 kg de resíduos dos quais 20 kg são de bagaço (CAMPOS, 2005). Dessa forma, há grande interesse na exploração desses resíduos gerados no processamento pela indústria do vinho, que na maioria das vezes são descartados ou aproveitados nos diversos processos de extração principalmente de antocianinas (ARVANITOYANNIS et al., 2006).

2.13.1 Bagaço da uva

O bagaço é o principal subproduto da vinificação não só pela riqueza alcoólica e tartárica, mas também pelo seu interesse econômico de alguns de seus componentes físicos. O bagaço é o produto resultante da prensagem das massas, constituído pelas partes sólidas das uvas e pelo mosto ou pelo conjunto mosto/vinho que embebe. Constituído pelas sementes, borras, sarro, engaços, folhelhos e o pedúnculo das uvas. O resíduo da prensagem representa 12 a 15% em peso de matéria-prima inicial, que contém restos de açúcar, outros glucídios, proteínas e nas sementes alto teor de lipídios que enriquecem altamente o bagaço, justificando calor de combustão desse produto que é mais elevado que a madeira.

A composição química varia dependendo do tipo de bagaço e da natureza das uvas que provém a vinificação e as condições atmosféricas. O tempo de duração da extração de cor varia em função dos seguintes fatores:

1. Maturação da uva madura torna mais fácil e rápida a extração de cor.
2. A fermentação se dá durante a extração tumultuosa, isto é, em plena atividade, na formação de álcool e este é um elemento que contribui para a extração da cor já que o álcool é solvente dos taninos.

3. Equipamento são sistemas rápidos de circulação de líquido da parte inferior à superior que encurtam os prazos de maceração em temperaturas altas (máximo 31°C) e facilitam a extração da cor, a qual influencia na composição de uvas no sistema de condução e o estado sanitário das uvas no momento da colheita influenciando na composição dos seus subprodutos.

O bagaço da uva é uma importante fonte de óleo; possui na semente entre 10 a 20% de óleo, é rico em ácidos graxos insaturados e ácidos graxos polinsaturados, contendo principalmente ácidos linoleico e linolênico, que são essenciais para o corpo humano. Desta forma, o óleo das sementes e do bagaço de uva, rico em ácido linoleico, pode representar fonte valiosa de óleo dietético (GÖKTÜRK; ÖZKAN; ÇETIN, 2007).

O bagaço é constituído principalmente de água, 60 a 70% de vinhos e borras, sendo este dependente da prensagem, etanol, metanol, glicerol, alcoóis superior, aldeídos, ésteres, ácidos voláteis, polifenóis, taninos, proteínas celulose, pectinas sais minerais e resíduos de açúcar.

Os principais fenólicos nas uvas são os flavonoides (antocianinas, flavonóis), os estilbenzenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzoico) e uma grande variedade de taninos (FRANCIS, 2000).

A distribuição dos compostos fenólicos nas uvas está representada na Figura 13.

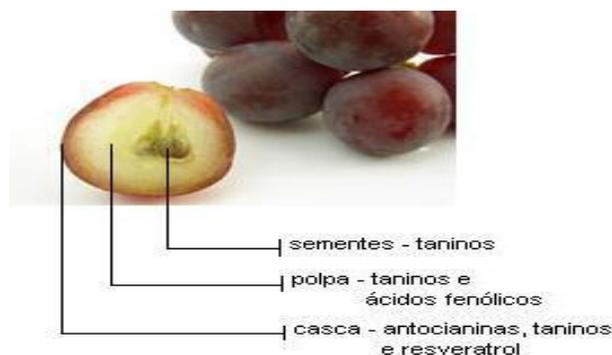


Figura 13 – Distribuição dos principais compostos fenólicos na uva.
Fonte: Francis (2000).

Os compostos fenólicos presentes nas uvas passam para o vinho com intensidade que depende das características do processo de vinificação. Mas, independente desta transferência e considerando que a maior parte destes compostos é encontrada nas partes sólidas das uvas, grande proporção permanece nos resíduos ou subprodutos da vinificação (ALONSO et al., 2002).

2.13.2 Engaços

São matérias-primas mais pobres e de valorização comercial baixa. Os engaços quando separados constituem cerca de 3-4,5% da massa da uva, e sua umidade é constituída de 50%. Na matéria seca predomina a celulose, cerca de 30-40%, com menor quantidade de matéria tartárico. A composição torna-se imprópria como alimento para o gado. O seu aproveitamento está limitado como matéria-prima para a indústria de papel e materiais de construção e como combustíveis, podendo ser utilizada para a obtenção de proteínas vegetal, pelo seu elevado teor celulósico.

O poder calorífico do engaço é da ordem de 2.000-2.500 calorias/kg, podendo ser aproveitado como combustíveis para alimentar os fornos da indústria do vinho, produzindo calor utilizado pelos secadores rotativos, sendo armazenado exclusivamente o excedente para posterior utilização na produção de vapor ou então a comercialização.

2.13.3 Folhelho

É um conjunto de material que é constituído essencialmente pelas películas. Constitui cerca de 40 a 50% do peso do bagaço fresco. Pode ser utilizado como adubação orgânica (tanto seco como úmido) ou incorporado em alimentos para animais e ainda como combustíveis.

Tabela 2 – Composição físico-química do folhelho

Quantidade (Valor recomendado)	Composição química
Umidade < 13%	2-10%
Materiais minerais	2,7-8,9%
Materiais gordos	5,2-7,8%
Proteínas > 11%	10,00-15,60%
Celulose < 22%	20,00-27,00%
Materiais azotados digeríveis	3,30-3,90%
Taninos	0,2-0,0%

Fonte: Silva (2002).

O folhelho é aproveitado para alimentação animal e para extração de pigmentos naturais, ainda pouco utilizados pelo baixo rendimento da operação, podendo ser usado como adubo orgânico. As oxidações e polimerização a que são sujeitos os bagaços durante o período de estocagem diminui consideravelmente o teor de antocianinas, baixando o rendimento de pigmentos naturais. Por isso, o aproveitamento deve incidir sobre o bagaço obtido imediatamente após a prensagem das massas.

2.13.4 Grainha

A grainha constitui de 20 a 25% do bagaço úmido e cerca de 40% do bagaço que é fortemente prensado, sendo o desengaço, representando 3% em relação do peso da uva (SILVA, 2002).

Tabela 3 – Composição média após a secagem das grainhas

Parâmetros	%
Umidade	7-9
Substâncias Gordas	14-20
Pentoses	9-12
Taninos	4- 4, 50
Celulose	30-33
Substância Azotada	9-10
Cinzas	2,5-4

Fonte: Silva (2002)

A grainha pode ser comercializada para ser usada nas indústrias de rações e adubos e ainda nas extrações de taninos para a indústria farmacêutica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DAS AMOSTRAS

O resíduo de uva processada composta da variedade Isabel e Bordô foi coletado na cidade de Marialva, Norte do Paraná, na latitude (23°29'06" Sul e 51°29'31"Oeste). O município participa com grande área, a 641 m acima do nível do mar, seu clima é subtropical, e os viticultores da área rural destacam na produção de uvas finas de mesa e ainda participam na produção de vinhos de boa qualidade. A Cooperativa Agroindustrial dos Viticultores de Marialva - Coavitti (Figura 14) foi escolhida para esta pesquisa porque há participação de pequenos agricultores. A coleta do material estudado foi feita em janeiro de 2009, após uma descuva de um tanque de fermentação para a produção do vinho. A seguir, o resíduo foi prensado para retirar o excedente do vinho numa pequena prensa mecânica. A Figura 15 mostra onde é descartado o resíduo, sendo coletadas várias amostras, que foram colocadas em sacos plásticos pretos de densidade 0,5 mm, acondicionados em caixas térmicas com gelo. Depois foram para o Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, para serem preservadas em freezer a -18°C, para posterior análise.



Figura 14 – Vista parcial da Cooperativa Agroindustrial dos Viticultores - Coavitti, ano dezembro de 2008 – Marialva-PR.



Figura 15 – Resíduo de uvas processadas em contêiner, com 20% da uva Bordô e 80% da uva Isabel.

O resíduo é estocado em contêiner (Figura 15) para posterior destino do mesmo, ou o próprio agricultor poderá levá-lo para o sítio para fazer a compostagem, como fertilizante orgânico, para posterior adição nas plantas das videiras, caracterizando assim como uma adubação orgânica, de excelente qualidade e também poderão fazer graspa, doce, geleia, farinha para consumo na alimentação, podendo extrair antocianinas que ficaram agregadas no resíduo das uvas processadas.

3.2 ANÁLISE QUÍMICA DAS ANTOCIANINAS

3.2.1 Extração

A extração das antocianinas é o primeiro passo para determinação do seu teor em qualquer tipo de tecido de plantas e resíduos. As antocianinas estão localizadas nos vacúolos das células hipodérmicas, próximas à superfície e o procedimento de extração, geralmente, envolve o uso de solventes ácidos que desnaturam a membrana do tecido celular e simultaneamente dissolvem os pigmentos (WROLSTAD; GIUSTI, 2001).

As antocianinas são pigmentos solúveis em solventes polares que, geralmente, são extraídos das plantas com metanol contendo ácido clorídrico ou ácido fórmico. A presença do ácido diminui o pH da solução e previne a degradação de antocianinas não-aciladas. Porém, pequenas quantidades de ácido podem causar hidrólise parcial ou total de moléculas acil de antocianinas aciladas que estão presentes em algumas plantas (COSTA; HORTON; MARGOLIS, 2000).

O etanol pode ser preferido para a extração de antocianinas, quando utilizadas em alimentos, pois seu potencial de extração é apenas levemente inferior ao metanol e pode evitar a toxicidade de soluções metanólicas. Os solventes podem ser parcialmente ou totalmente eliminados em rota-evaporador em temperatura que variam de 30 a 40°C. As temperaturas mais elevadas podem degradar as antocianinas durante a concentração do extrato (WROLSTAD; GIUSTI, 2001).

A extração do resíduo de uvas processadas foi realizada em triplicata, com a quantidade de 100 g de amostra num béquer com solução extratora (70 mL de etanol 70% e 30 mL de HCl 0,1% em pH 2,0). Segundo Ju e Howard (2003), a extração foi realizada com 200 mL da solução extratora, e homogeneizada num processador durante 2 min, deixando em repouso durante 12h na geladeira a $4\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, coberto com filme magipak e o béquer envolto com papel alumínio para evitar a degradação.

3.2.2 Medidas de potencial de hidrogênio

O pH é a medida do potencial de hidrogênio das soluções aquosas para a execução das leituras de pH; as soluções devem estar em agitação e o pH metro devidamente calibrado. O pH metro utilizado nos ensaios foi o modelo Q400A da marca Quimis. Para medir e monitorar a evolução do pH em solução aquosa, o pH metro deve estar calibrado frente a duas soluções tampão de pH (4,0 e 7,0). Este ajuste é adequado para operação em pH ácido. O procedimento de calibração é simples e segue as orientações contidas no manual do fabricante. Por se tratar de uma leitura direta, não é necessária a realização de nenhum cálculo e nem proceder com diluições para adequar a faixa de leitura do equipamento.

3.2.3 Filtração

Após as 12h de repouso na geladeira a $4\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, retiraram-se as amostras, e foi feita uma primeira filtração, para retirar parte do resíduo mais grosso, usando pano de náilon, e o extrato recolhido num erlenmeyer. Em seguida, uma segunda filtração a vácuo, com papel de filtro Whatman nº1,

recolhido em outro erlenmeyer, e completando o volume final num balão volumétrico de 250 mL, com a solução extratora, onde foram guardados em frascos âmbar e estocadas na geladeira a $4\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ para posterior realização das análises quantitativas das antocianinas.

3.2.4 Determinação espectrofotométrica UV-Vis

A determinação de antocianinas envolve diferentes técnicas, podendo avaliar o conteúdo das antocianinas totais ou individualmente. O teor de antocianinas totais é determinado em extrato bruto contendo outros compostos fenólicos naturalmente presentes pela medida da absorvitividade de uma solução contendo um comprimento de onda (nm) específico (JU; HOWARD, 2003).

As antocianinas podem ser identificadas por várias técnicas, e as mais utilizadas são espectroscopia ultravioleta e visível (UV - Vis), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (ou do inglês: *Nuclear Magnetic Resonance* NMR), e HPLC (TERCI, 2004). Importante distinguir procedimentos que identificam a classe das antocianinas e os procedimentos que identificam cada antocianina presente. O espectro eletrônico de absorção das antocianinas e suas agliconas têm sido muito úteis para a identificação desta classe de pigmentos. Isso é possível porque as antocianinas possuem absorção máxima na região visível entre 500 e 535 nm.

Nos extratos aquosos foram feitas as medidas de absorbância que foram realizadas no espectrofotômetro UV-Vis, marca Hitachi 2001 (Figura 16), com comprimento de onda de 535 nm.



Figura 16 – Equipamento utilizado para as análises espectrofotométricas UV-Vis, Marca Hitachi 2001.

Foram retirados da solução estoque a $4\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ uma alíquota de 2,0 mL para um balão volumétrico de 25 mL e completado o volume com solução extratora (70 mL de etanol 70% e 30 mL de HCl 0,1% em pH 2,0), deixando em temperatura ambiente e no escuro por 2h, zerando o equipamento com solução extratora. Para a determinação da concentração das antocianinas (antocianinas totais mg/100 g), usou-se a expressão da Equação 1 que apresenta o cálculo simplificado para a sua determinação (VANINI; KWIATKOWSKI; CLEMENTE, 2009).

$$\begin{aligned} \text{FD} &= \text{VEB} / \text{VA} \times \text{VS} \\ \text{AT (mg / 100g)} &= \text{A} \times \text{FD} / \text{E}^{1\%}_{1\text{ cm}} \end{aligned} \quad (1)$$

em que:

FD = fator de diluição.

VEB = volume do extrato bruto (250 mL).

VA = Volume da alíquota do extrato utilizado para a diluição em solução extratora (2 mL).

VS = Volume da solução utilizado para a diluição do extrato (25 mL)

AT = Antocianinas totais (mg) por 100 g de amostra.

A = Absorbância do extrato diluído no comprimento de onda de máxima absorção.

$\text{E}^{1\%}_{1\text{ cm}} = 98,20$; Coeficiente de absortividade molar para uma mistura de antocianinas purificadas do extrato de uvas processadas.

3.2.5 Parâmetros de degradação

Os cálculos da constante de velocidade de degradação (K), tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) e % de retenção de cor (%R) (GRIS et al., 2004) são utilizados para analisar a degradação dos pigmentos antociânicos em função do tempo. A velocidade de degradação dos pigmentos e ($t_{1/2}$) podem ser calculados de acordo com as Equações 2 e 3, respectivamente (VANINI; KWIATKOWSKI; CLEMENTE, 2009).

$$k.t = -2,303 \times \log At_x / At_0 \quad (2)$$

$$t_{1/2} = 0,693 / k \quad .. \quad (3)$$

em que:

At_x = Absorbância em relação ao tempo final do experimento.

At_0 = Absorbância no tempo zero, inicial do experimento.

K = Constante de velocidade (hs^{-1}).

t = Tempo (dias, horas, minutos, segundos).

$t_{1/2}$ = Tempo de meia vida.

A porcentagem de retenção de cor (%R), em relação ao tempo, pode ser calculada pelas absorbâncias lidas, utilizando a Equação 4 (VANINI; KWIATKOWSKI; CLEMENTE, 2009).

$$\% R = At_x / At_0 \times 100 \quad (4)$$

em que:

% R = Porcentagem de retenção de cor

At_x = Absorbância em função do tempo final do experimento.

At_0 = Absorbância no tempo zero, inicial do experimento.

3.2.6 Determinação por HPLC

3.2.6.1 Equipamento

O equipamento utilizado consta de uma coluna (Acer 5,C-18) de 25 cm x 4,6 mm.I.D da termo, modelo, Scientific, Finngan Surveyor Lc Pump plus (Figura 17) do Laboratório de Pesquisa do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá-PR.



Figura 17 – Equipamento de Cromatografia Líquida de alta Eficiência-HPLC.

3.2.6.2 Reagentes

Os solventes orgânicos usados no HPLC foram: Acetonitrila PA, ácido fórmico PA, água deionizada e Metanol PA. Todos os reagentes foram da marca Merck.

Reagentes usados para o teste da estabilidade com os ácidos orgânicos.

Ácido cafeico, Sigma, co625-2g.

Ácido ferúlico, Aldrich, ca12870-8.

Ácido p-cumárico, Sigma, c9008-5g.

3.2.6.3 Separação das antocianinas

As antocianinas foram isoladas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Esta etapa foi realizada no Laboratório do Mestrado em Química, sendo controlado pelo software, que também é responsável pela obtenção e tratamentos dos dados, instalado em um computador (HP), com sistema operacional Windows XP.

A separação foi realizada com uma coluna de fase reversa (Acer 5,C-18) de 25 cm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno com partículas de 5 μ m de diâmetro médio. O volume de injeção foi de 20 μ L, os dois

comprimentos de onda utilizados foram 520 e 530 nm e, a temperatura e a vazão controladas a 25°C 1 mL/min, respectivamente. Segundo Luczkiewicz e Cisowski (1998), para o diluente foi utilizado um gradiente formado a partir de duas soluções: solvente A = (90% de água destilada deionizada, 10% de ácido fórmico) e o solvente B = (22,5% de metanol, 22,5% de acetonitrila, 45% de água destilada deionizada, 10% de ácido fórmico). O diluente seguiu um gradiente começado de 0 min a 1 min 100% de A, após 1 min até os 30 min 0% a 30% em B em A, para fazer o gradiente linear, e de 30 min a 60 min 30% de B em A, entre as amostras a um período de equilíbrio em 10 min nas análises.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA DAS ANTOCIANINAS TOTAIS

Para as identificações de antocianinas em vários alimentos e plantas, dois procedimentos que podem ser utilizados na comparação direta, quando há disponibilidade de ter material padrão, ou comparação indireta, se não houver material padrão. Nesse caso, uma comparação cuidadosa com os dados da literatura é aceitável. A comparação indireta, embora seja um método sujeito a erros, é justificada pela falta de padrões e pelo trabalhoso procedimento para a identificação, e pela dificuldade de obtenção e pelo elevado preço de padrões de antocianina.

A espectrofotometria UV-Vis é uma ferramenta auxiliar muito importante nas determinações de antocianinas em que os espectros de absorção são mostrados. Nas Figuras 18 e 19, foi feito um espectro de absorção no extrato da uva Bordô, e do extrato da uva Isabel, para a verificação do comprimento de onda de máxima absorção.

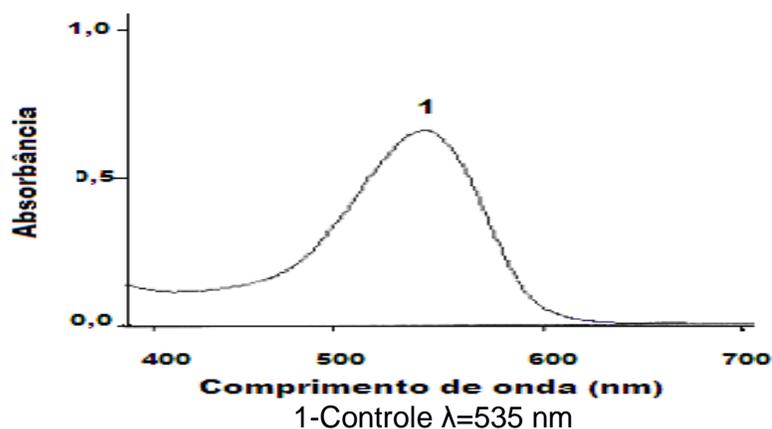


Figura 18 – Espectro de absorção na região UV-Vis, da uva Bordô, (*Vitis labrusca*), em condição, temperatura ambiente e na ausência de luz, realizado após a sua extração e filtração, com solução extratora (70 mL de etanol 70% e 30 mL de HCl 0,1% em pH 2,0)

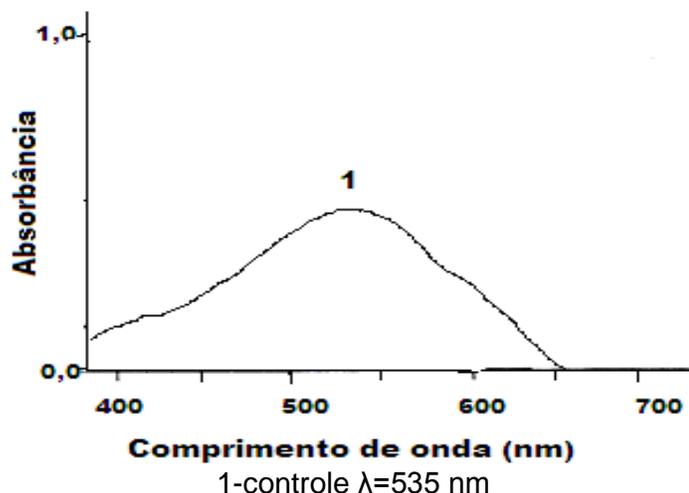


Figura 19 – Espectro de absorção na região UV-Vis, da uva Isabel (*Vitis labrusca*) em condição, temperatura ambiente e na ausência de luz, realizado após a sua extração e filtração, com solução extratora (70 mL de etanol 70% e 30 mL de HCl 0,1% em pH 2,0).

Munõz-Espada et al. (2004) encontraram valores do presente estudo, utilizando casca (bagaço) de uva da cultivar “Concord”, e obtiveram antocianinas totais de 330 mg/100 g. A literatura relata que a quantidade e a composição das antocianinas presentes nas Uvas em bagaço diferem de acordo com a espécie, cultivar, maturidade, condições climáticas (MATTIVI et al., 2006; MUNÕZ-ESPADA et al., 2004). O conteúdo de antocianinas, em uvas tintas, varia de 30 a 750 mg/100 g da fruta madura. Em uvas “Concord”, os valores variaram entre 61 a 112 mg/100 g. Enquanto que em uvas *Vitis viníferas* como “Pinot Noir”, “Cabernet Sauvignon” e “Vincent”, apresentaram concentrações médias de antocianinas de 33,92 a 439 por mg/100 g. Recentemente, Mattivi et al. (2006) encontraram para uvas *Vitis viníferas* “Cabernet Sauvignon, Syrratt”, “Cabernet France”, “Merlot” e “Pinot Noir” médias de antocianinas de 215, 234, 179, 115, e 99 mg/100 g, respectivamente.

As amostras foram determinadas nas condições de temperatura ambiente e na ausência de luz, com solução extratora (70 mL de etanol 70% e 30 mL de HCl 0,1% em pH 2,0). Nessa forma de cátion flavílio apresenta a coloração vermelha. O fato de o cátion flavílio ser estável em pH, menor. A coloração vermelha das antocianinas é perdida em pH superior a 4,0 para

aplicação geral o pH entre 1,0 e 3,0 confere maior estabilidade às antocianinas. Em pH alto, esse cátion é convertido em outras espécies incolores. A concentração mínima de antocianinas totais na uva Bordô foi de 180,8 mg/100 g (Tabela 4) e a concentração máxima foram de 211,4 mg/100 g, e da uva Isabel, a concentração mínima de antocianinas totais na uva de 8,9 mg/100 g, e a concentração máxima foi 12,3 mg/100 g. Na mistura das uvas (20% da Bordô e 80% Isabel), a concentração mínima de antocianinas totais foi de 43,2 mg/100 g, e a concentração máxima foi de 51,1 mg/100 g. A concentração mínima obtida de antocianinas totais do resíduo de uvas processadas foi de 23,1 mg/100 g e a concentração máxima foi de 28,2 mg/100 g. A recuperação de antocianinas nas uvas processadas foi de 52,50% em relação à quantidade da mistura que foi de 48,70 mg/100 g.

Tabela 4 – Teores de antocianinas totais, nas uvas e no resíduo de uvas, processadas

Ensaio	Uva Bordô (uva) mg/100 g	Uva Isabel (uva) mg/100 g	Mistura (20% da uva Bordô, 80% da uva Isabel) mg/100 g	Resíduo de uva processada mg/100 g
1	206,2	10,0	49,2	24,2
2	200,7	9,5	47,7	26,3
3	180,8	8,9	43,2	23,1
4	210,0	11,4	51,1	28,2
5	211,4	10,7	50,8	27,2
6	200,0	12,3	49,8	23,2
7	197,0	12,2	49,1	27,3
Médias	200,8	9,2	48,7	25,6

4.2 SEPARAÇÃO DAS FRAÇÕES DE ANTOCIANINAS POR HPLC

A separação das antocianinas tem ocorrido tradicionalmente por técnicas cromatográficas, especialmente por cromatografia em papel, empregando-se diferentes sistemas de solventes como fase móvel. No entanto, a mais rápida e eficiente separação de misturas complexas de antocianinas é realizada por cromatografia líquida de alta eficiência HPLC. A técnica não é destrutiva e, portanto, os picos separados podem ser coletados para análises

posteriores. Além disso, a HPLC pode ser usada para separar e quantificar microgramas de antocianinas sem necessitar de extensa purificação preliminar das amostras. A técnica de HPLC está na grande maioria das vezes apenas na etapa de separação, pois existe grande dificuldade na identificação de antocianinas, não apenas em HPLC, mas em todas as outras técnicas, pela falta de padrões de pigmentos antociânicos.

Tabela 5 – Valores de referencias de padrão com seu tempo de retenção de antocianinas de uvas vermelhas.

Pico	Tr (min)	Antocianinas
1	22,8	Delfinidina 3-glicosídeo
2	28,3	Cianidina 3-glicosídeo
3	33,6	Petunidina 3-glicosídeo
4	40,4	Peonidina 3-glicosídeo
5	44,9	Malvidina 3-glicosídeo
6	74,1	Delfinidina 3-(6"-coumaroyl)glicosídeo

Fonte: Xianli e Prior (2005).

Atualmente, a técnica mais utilizada, para separação de antocianinas HPLC em fase reversa. Este tipo de cromatografia utiliza instrumentos sofisticados que podem ser totalmente automatizados. Sendo o tipo de cromatografia líquida que se emprega em colunas fechadas e recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é diluída a altas pressões, apresentando a capacidade de realizar separações de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade, para a determinação de tipos de antocianinas.

4.2.1 Separação das frações de antocianinas na uva Bordô

Para as separações das frações de antocianinas no bagaço da uva Bordô (JU; HOWARD, 2003). Para leituras no HPLC, as amostras foram filtradas a vácuo com papel Millipore 0,45 µm (Figura 20), picos com os seus tempos de retenção de antocianinas encontram-se na Tabela 6, por comparação com o tempo de retenção obtidos na Tabela 6 (XIANLI; RONALD,

2005), sendo estes comparados pelo tempo de retenção dos padrões de referências, mas pela falta de padrões de antocianinas, dos quais foram obtidos os cinco principais picos de antocianinas.

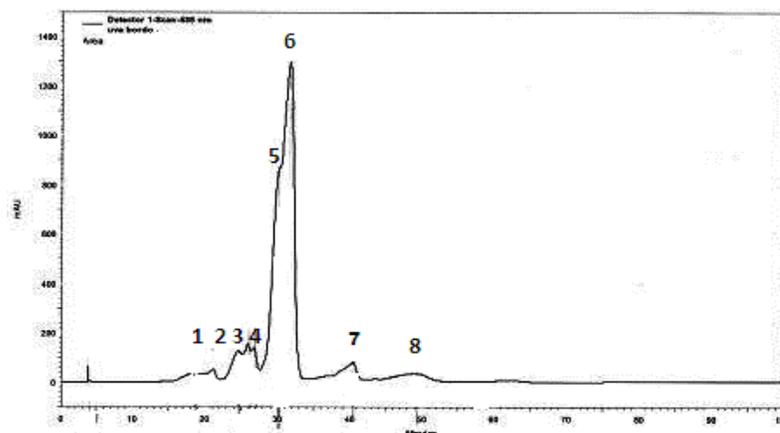


Figura 20 – Cromatograma de HPLC, comprimento de onda, 535 nm, solução extratora (70 mL de etanol 70% e 30 mL de HCl 0,1% em pH 2,0) e filtração a vácuo com papel Millipore de 0,45 μm , da uva Bordô.

Tabela 6 – Comparação com o tempo de retenção de uvas vermelhas da Tabela 5, no cromatograma de HPLC da uva Bordô

Pico	Tr (min)	Antocianinas
1	18,0	nd
2	22,5	Delfinidina 3-glicosídeo
3	25,0	nd
4	26,0	nd
5	30,0	Cianidina 3-glicosídeo
6	32,0	Petunidina 3-glicosídeo
7	40,0	Peonidina 3-glicosídeo
8	49,0	Malvidina 3-glicosídeo

As frações de antocianinas encontradas na Tabela 6, pela ordem dos picos foram: Delfinidina 3-glicosídeo, Cianidina 3-glicosídeo, Petunidina 3-glicosídeo, Peonidina 3-glicosídeo, Malvidina 3-glicosídeo.

4.2.2 Separação das frações de antocianinas na uva Isabel

Para as determinações das frações de antocianinas (bagaço) da uva Isabel (JU; HOWARD, 2003), após a extração, foi filtrada a vácuo com filtro

Millipore 0,45 μm . A Figura 21 mostra os picos das antocianinas que foram analisadas por HPLC.

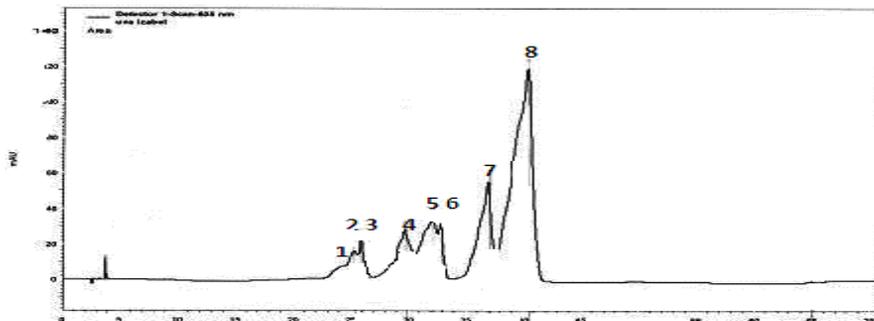


Figura 21 – Cromatograma de HPLC, a 535 nm, após sua extração, e filtração com papel Millipore a 0,45 μm , com solução extratora (70 mL de etanol 70% e 30 mL HCl 0,1% em pH 2,00) na uva Isabel.

A Tabela 7 mostra um total de oito picos que foram obtidos no HPLC num comprimento de onda utilizado de 535 nm, onde foram comparados com os tempos de retenção obtidos (Tabela 5) por Xianli e Ronald (2005), calculados minuciosamente pelo tempo de retenção, dos padrões específicos de referencias; isso é pela falta de padrões de antocianinas, onde foram detectadas as principais antocianinas. Pela ordem dos picos foram encontradas: Delfinidina 3-glicosídeo, Cianidina 3-glicosídeo, Petunidina 3-glicosídeo, Peonidina 3-glicosídeo.

Tabela 7 – Comparação com o tempo de retenção de uvas vermelhas da Tabela 5 no cromatograma de HPLC da uva Isabel

Pico	Tr (min)	Antocianinas
1	23,0	Delfinidina 3-glicosídeo
2	26,0	Nd
3	27,0	Nd
4	30,0	Cianidina 3-glicosídeo
5	32,0	Nd
6	33,0	Petunidina 3-glicosídeo
7	37,0	Nd
8	41,0	Peonidina 3-glicosídeo

Para a determinação da mistura do resíduo da uva processada, foram retirados do freezer a -18°C várias amostras, constituído de 80% da uva Isabel e 20% da uva Bordô, a solução extratora usado (JU; HOWARD, 2003), após sua extração foi filtrada a vácuo com papel Millipore $0,45\mu\text{m}$, onde mostra os picos das determinações das antocianinas analisadas por HPLC, que após foi obtido o seguinte cromatograma mostrado na Figura 22.

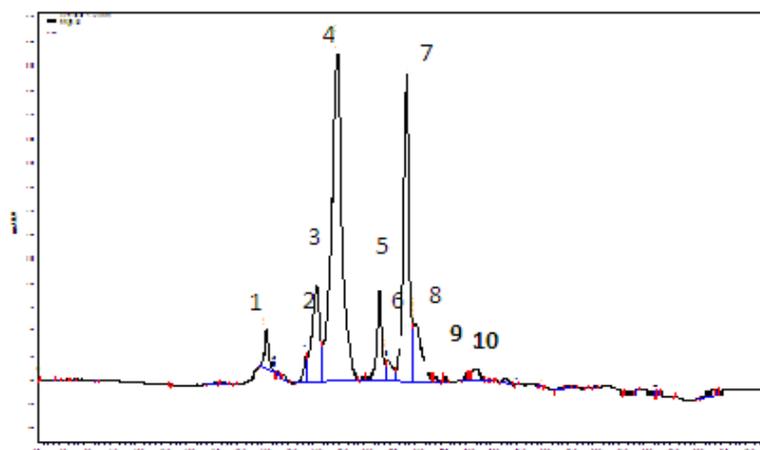


Figura 22 – Cromatograma de HPLC, com o solução extratora (70 mL de etanol 70%, e 30 mL HCl 0,1% em pH 2,00), de antocianinas do resíduo de uvas processadas.

A Tabela 8 mostra um total de dez picos que foram obtidos no HPLC num comprimento de onda de 535 nm, e com os seus tempos de retenção e foram comparados com os tempos constantes na Tabela 6 (XIANLI; RONALD, 2005), sendo calculados minuciosamente pelo tempo de retenção, do padrão pela falta de padrões de antocianinas foram detectadas as principais antocianinas. Pela ordem dos picos foram encontradas: Delfinidina 3-glicosídeo, Cianidina 3-glicosídeo, Petunidina 3-glicosídeo, Peonidina 3-glicosídeo, Malvidina 3-glicosídeo.

Tabela 8 – Comparação pelo tempo de retenção em relação a uvas vermelhas da Tabela 5 no cromatograma de HPLC, da mistura do resíduo das uvas processadas.

Pico	Tr (min)	Antocianinas
1	22,5	Delfinidina-3-glicosídeo
2	26,5	nd
3	27,5	Cianidina-3-glicosídeo
4*	29,0	Petunidina-3-glicosídeo
5	33,0	nd
6	35,0	nd
7*	36,0	Peonidina-3-glicosídeo
8	37,5	nd
9	40,5	nd
10	43,0	Malvidina-3-glicosídeo

nd –não-detectado;*=picos maior intensidade.

4.3 ESTABILIDADE COM ÁCIDOS ORGÂNICOS NO EXTRATO DO RESÍDUO

4.3.1 Adição de ácido cafeico

A presença de ácido cafeico na molécula aumenta a estabilidade das antocianinas, e a existência de interação entre o cromóforo de pelargonidina e grupos cafeil de antocianinas extraídas de pétulas de Pharbits nil (cultivares vermelho-púrpura). Houve aumento nos valores de absorbância (efeito hiperacrômico) bem como deslocamento batocrômico, geralmente entre 5 e 20 nm ou mais, no comprimento máximo de absorção. Observa-se que na Figura 23, a absorção na região UV-Vis da solução extratora resíduo, com os tratamentos com ácido cafeico, teve efeito hiperacrômico nas concentrações de (0,5:1 p/v), linha da cor azul; observou-se também aumento de absorbância, em relação ao controle que é a linha da cor vermelha, sem ácido cafeico, a linha da cor verde (0,8:1 p/v) e linha da cor marrom (1:1 p/v) tiveram aumento na absorbância, com efeito hiperacrômico em relação ao controle, sendo usado o comprimento de onda de 535 nm.

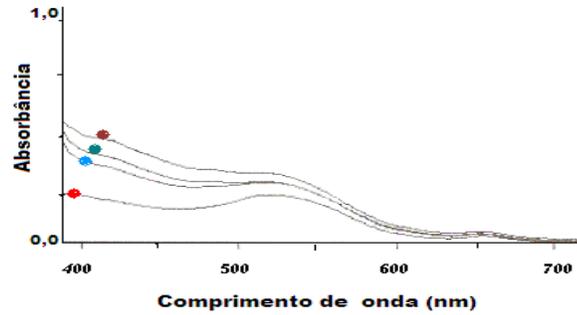


Figura 23 – Espectro de absorção na região UV-Vis, da mistura do resíduo da uva processada (*Vitis labrusca*), na presença do ácido cafeico - Linha da cor vermelha - sem tratamento, Linha da cor azul com tratamento -(0,5: 1 p/v), Linha da cor verde com tratamento - (0,8: 1 p/v), Linha da cor marrom com tratamento - (1: 1 p/v), em condições de temperatura ambiente e na ausência de luz.

O complexo pigmento/copigmento formado é dependente da concentração de ambos à medida que aumenta a relação copigmento/antocianinas; o aumento no primeiro dia nas absorbâncias das amostras, com efeito, hipercrômico, ocorre pelo coeficiente de absorção, aumentando as concentrações das moléculas coloridas no comprimento de onda de máxima absorção nos tratamentos sem adição e com ácido cafeico nas concentrações (0,5:1 p/v), (0,8:1 p/v) e (1:1 p/v) como mostra a Figura 24.

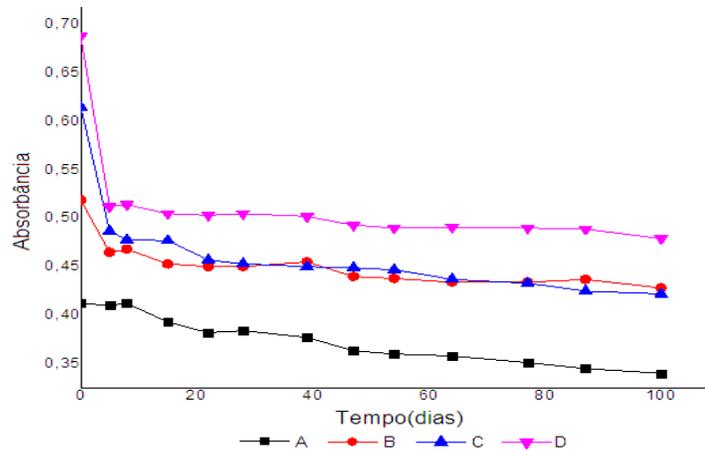


Figura 24 – Leituras de absorbância de antocianinas com concentração de ácido cafeico em tempo (dias). B = controle pH 2,0 temperatura ambiente no escuro: C = teste (0,5:1 p/v) temperatura ambiente no escuro: D = teste (0,8:1 p/v) temperatura ambiente no escuro: E = teste (1:1 p/v) temperatura ambiente no escuro, comprimento de onda 535 nm.

Após o sétimo dia, houve diminuição na absorvância em relação ao controle, que pode ser explicado por uma redução local na polaridade do cromóforo flavilium, causado pelo envolvimento deste com o copigmento pela associação hidrofóbica. Após este processo, as amostras tiveram constante linearidade das absorvâncias das concentrações adicionadas de ácido cafeico, no experimento realizado.

O experimento realizado com ácido cafeico (1:1 p/v) e (0,8:1 p/v) teve a menor retenção da cor de 69,62 e 69,11%. Neste experimento foi observado que, na adição de ácido cafeico, os valores de absorvância foram maiores em relação ao controle, isso foi mostrado por Darías-Martín (2001), que ao adicionar quantidade de ácido cafeico ao vinho, e ao final de 90 dias, verificaram que teve aumento de 60% nos valores de absorvâncias no vinho. Isso mostra que o ácido cafeico tem estabilidade, com aumento de concentração de antocianinas, como é mostrado no controle, havendo retenção da cor de 82,52%, com um tempo de meia vida de 15,03 dias, e na amostra (0,5:1 p/v), teve maior retenção na cor de 82,47%, e com tempo de meia vida de 15,04 dias em relação às outras concentrações.

Tabela 9 – Retenção da cor (%R) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$), mistura de resíduo da uva processada, com adição de ácido cafeico

Tratamento	Controle	0,5:1	0,8:1	1:1
R	82,52	82,47	69,11	69,62
$t_{1/2}$	15,03	15,04	7,81	7,97

Valores de absorvância das amostras de resíduo das antocianinas adicionado ácido cafeico, cálculo referente a Tabela 7A do Apêndice.

Fonte: Katsaboxakis, Papanicolaou e Melanitou (1998).

A análise realizada no HPLC, com extrato de antocianinas e na adição de ácido cafeico, conforme Figura 25, foi comparada com os dados contidos na Tabela 6. Foram encontrados quatro picos, sendo os mais comuns encontrados no extrato da mistura do resíduo de uva processada, descrita na Tabela 10 Delfinidina 3-glicosídeo, Cianidina 3-glicosídeo Petunidina 3-glicosídeo Peonidina 3-glicosídeo.

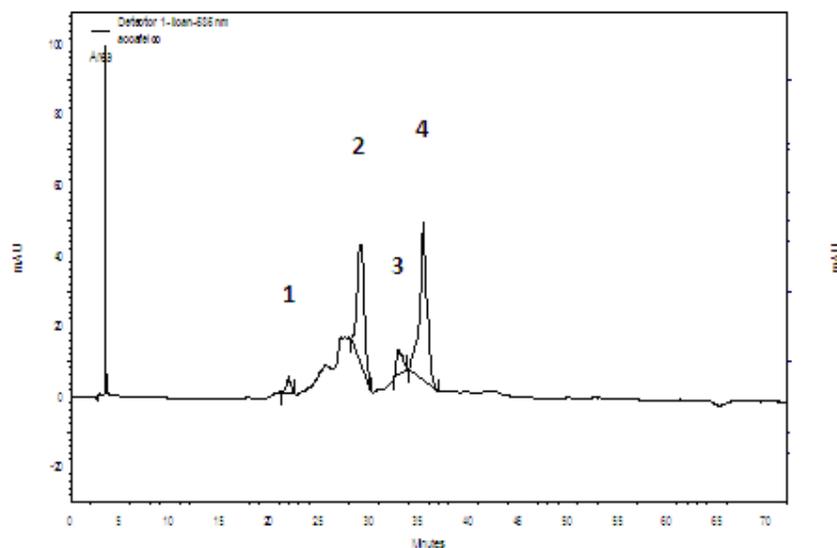


Figura 25 – Cromatograma de HPLC, de antocianinas no resíduo de uva processada, com adição de ácido cafeico.

Tabela 10 – Comparação pelo tempo de retenção em relação a uvas vermelhas, da Tabela 5 no cromatograma de HPLC da Figura 25, da mistura de resíduo de uvas processadas com 80% da uva Isabel e 20% da uva Bordô na adição de ácido cafeico

Pico	Tr (min)	Antocianinas
1	22,50	Delfinidina 3-glicosídeo
2*	29,00	Cianidina 3-glicosídeo
3*	32,50	Petunidina 3-glicosídeo
4	36,00	Peonidina 3-glicosídeo

*= picos de maior intensidade

4.3.2 Adição de ácido p-cumárico

O aumento nos valores de absorvância (efeito hiperacrômico) bem como o deslocamento batocrômico, geralmente entre 5 e 20 nm ou mais ou menos, no comprimento máxima de absorção, observa-se (Figura 26) na solução extratora da mistura de resíduo de uvas processadas, com adição nos tratamentos com ácido p-cumárico, e o controle sem adição de ácido, os outros tratamentos foram adicionados à quantidade de ácido p-cumárico (0,5:1 p/v); (0,8:1 p/v); (1:1 p/v). Neste experimento, as leituras foram realizadas em temperatura ambiente e ausência de luz.

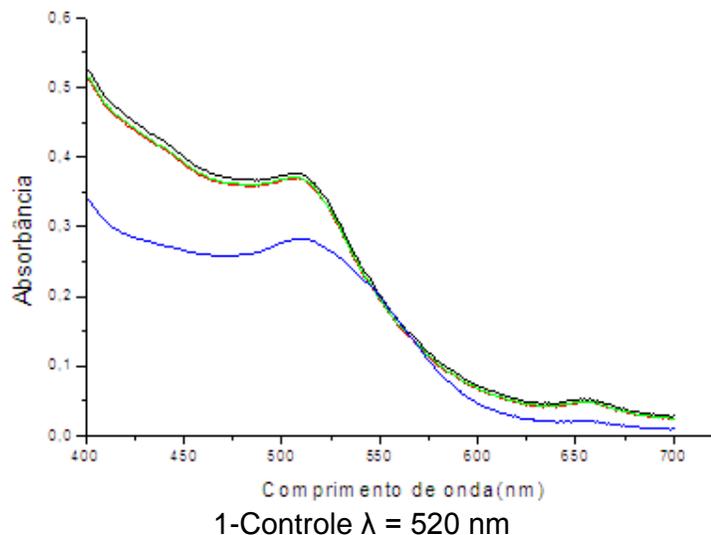


Figura 26 – Espectro de absorção na região UV-Vis, da mistura do resíduo da uva processada da uva, na presença do ácido p-cumárico. As linhas estão praticamente sobrepostas em 520 nm, nas concentrações do ácido, (0,5:1 p/v); (0,8:1 p/v); (1:1 p/v), em condições de temperatura ambiente e na ausência de luz.

A acilação com ácido cinâmico (p-cumárico) demonstrou efeito considerável nas características de cor de todos os derivados. A natureza do açúcar e as diferentes posições onde o ácido cinâmico se liga ao açúcar são fatores suficientes capazes de conferir características de cores diferentes à molécula de antocianinas. A reação de copigmentação estabiliza as antocianinas em suas formas coloridas e retarda a reação normal de hidratação. Por isso, assume que a copigmentação seja um processo seletivo das formas coloridas. O aumento da estabilidade ocorre, pois o copigmento compete com a água e interage com as antocianinas, complexando com as formas coloridas e modificando a natureza do copigmento (Figura 27). Aumento no valor de absorbância (efeito hiperacrômico) com maior intensidade no controle, sem adição do ácido p-cúmarico, no primeiro dia, e em relação com adição do ácido p-cúmarico nas concentrações de (0,5:1 p/v); (0,8:1 p/v); (1:1 p/v). A adição do ácido p-cumárico (0,8:1 p/v) não foram significativa com o controle e com relação às outras concentrações, os valores de absorbâncias foram praticamente iguais, e estabilizando, sendo conduzido o experimento durante 160 dias.

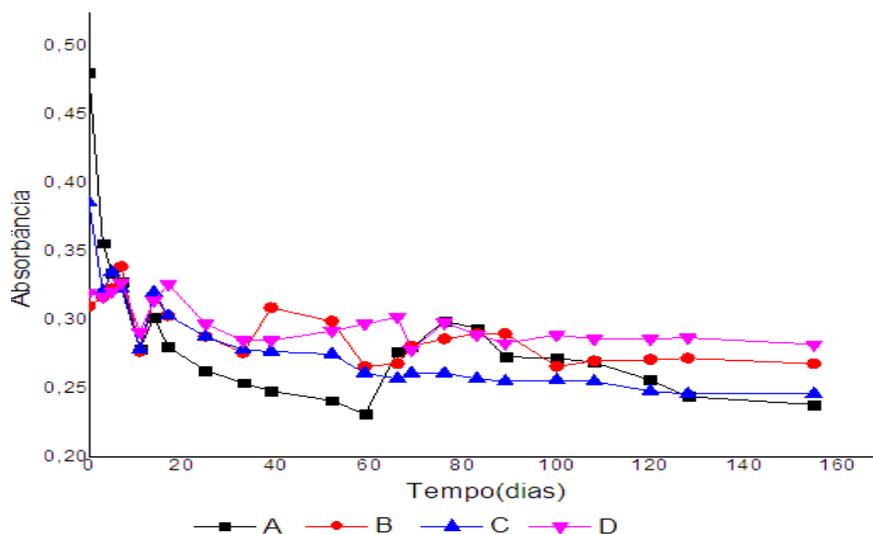


Figura 27 – Leituras de absorvância lidas em 520 nm, de antocianinas com ácido p-cúmarico em tempo (dias). B = controle pH, 2,0 temperatura ambiente no escuro: C = teste (0,5:1 p/v) temperatura ambiente no escuro: D = teste (0,8:1 p/v) temperatura ambiente no escuro: E = teste (1:1 p/v) temperatura ambiente no escuro.

Tabela 11 – Retenção da cor (%R) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$), mistura do resíduo de uvas processadas, com adição de ácido p-cumárico.

Tratamento	Controle	0,5:1	0,8:1	1:1
R	49,48	86,45	62,73	88,13
$t_{1/2}$	6,41	31,35	10,11	36,09

Valores de absorvância das amostras de resíduo das antocianina adicionado ácido p-cumárico, cálculo referente a Tabela 6A do Apêndice.

Fonte: Katsaboxakis, Papanicolaou e Melanitou (1998).

O controle sem adição de ácido, a retenção da cor foi baixa (49,48%) e o tempo de meia vida 6,41% a melhor retenção da cor foi com o tratamento (1:1 p/v), de 88,13% e o tempo de meia 36,09% por meio do experimento, mostra que a estabilidade na adição de ácido p-cumárico foi significativo nas duas concentrações (1:1 p/v); e (0,5:1 p/v). O que teve melhor desenvolvimento para manter a estabilidade, em relação à adição dos ácidos orgânicos p-cumárico na concentração de (1:1 p/v), maior concentração em relação ao controle, sem adição de ácido.

Em relação ao cromatograma da (Figura 28) realizado por HPLC, utilizando antocianinas com adição de concentrações de ácido p-cumárico,

pode-se observar que pela Tabela 5 tem-se o tempo de retenção conhecida e nas amostras de antocianinas foram encontrados cinco tipos de pico. Na análise, foi encontrada uma antocianina diferente sendo a Delfinidina 3-(6''-coumaroyl) glicosídeo e as mais comuns encontradas no extrato do resíduo de uva processada (Tabela 12), Delfinidina 3-glicosídeo, Cianidina 3-glicosídeo, Petunidina 3-glicosídeo, Malvidina 3-glicosídeo.

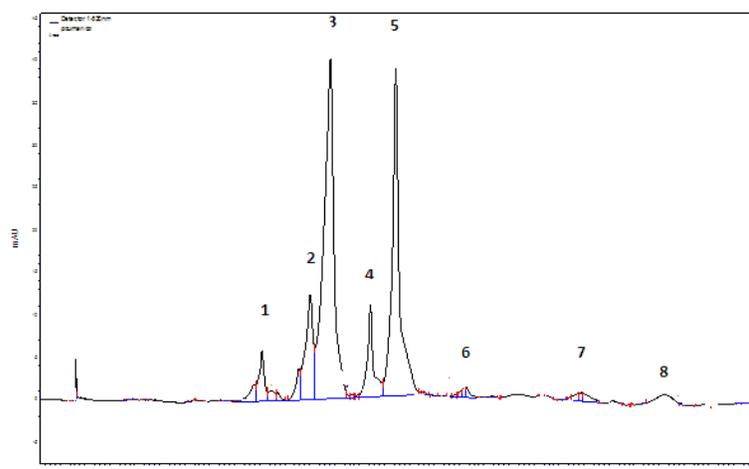


Figura 28 – Cromatograma de HPLC, de antocianinas no resíduo de uva processada, com adição de ácido p-cumárico, na preparação (Figura 27).

Tabela12 – Comparação pelo tempo de retenção em relação a uvas vermelhas, (Tabela 5) no cromatograma de HPLC da (Figura 28), da mistura do resíduo de uvas processadas com 80% da uva Isabel e 20% da uva Bordô na adição de ácido p-cumárico.

Pico	Tr (min)	Antocianinas
1	22,5	Delfinidina 3-glicosídeo
2	27,5	nd
3*	29,5	Cianidina 3-glicosídeo
4	33,0	nd
5*	37,5	Petunidina 3-glicosídeo
6	43,5	Malvidina 3-glicosídeo
7	52,5	nd
8	62,5	Delfinidina 3-(6''-coumaroyl)glicosídeo

nd - não-detectado.

*=picos de maior intensidade.

4.3.3 Adição de ácido ferúlico

Um aumento nos valores de absorvância foi verificado (Figura 29) (efeito hiperacrômico) na linha da cor verde e na linha da cor marrom com adição de ácido ferúlico, em temperatura ambiente e no escuro. Os tratamentos continham ácido ferúlico na concentração em temperatura ambiente e no escuro. Na linha de cor azul, e a linha da cor vermelha não houve aumento na absorvância.

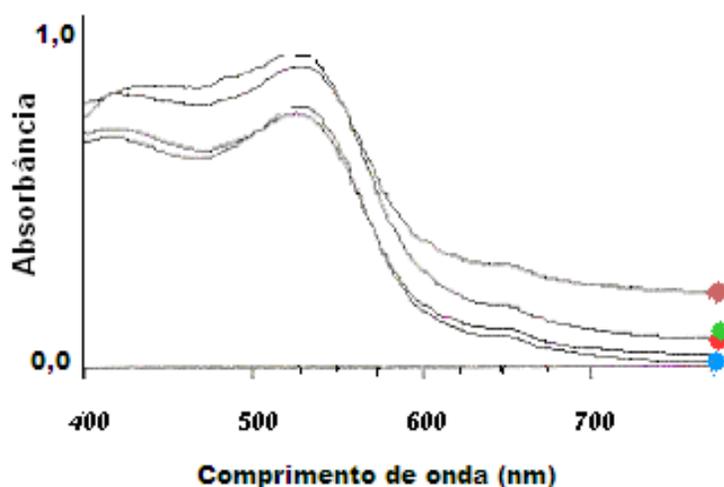


Figura 29 – Espectros de absorção na região UV-Vis da mistura do resíduo da uva processada (*Vitis labrusca*), na presença do ácido ferúlico - Linha da cor azul - com tratamento: (0,5:1 p/v), Linha da cor vermelha com tratamento: (0,8:1 p/v), Linha da cor verde - sem tratamento, linha da cor marrom (1:1 p/v), em condições de temperatura ambiente e na ausência de luz.

O experimento da estabilidade foi realizado com um comprimento onda de máxima absorvância (Figura 29) em 525 nm, em temperatura ambiente e no escuro, após as 2h de repouso - somente no primeiro dia; nos outros dias no mesmo horário, foi lida a absorvância depois de retirada da ausência de luz. As leituras foram realizadas no espectrômetro de UV-Vis da Figura 16 em absorvância no extrato de resíduo de uvas processadas em pH 2,0 contendo antocianinas com adição de ácido ferúlico em tempo (dias). A Figura 30 mostra a degradação das antocianinas ao longo do experimento.

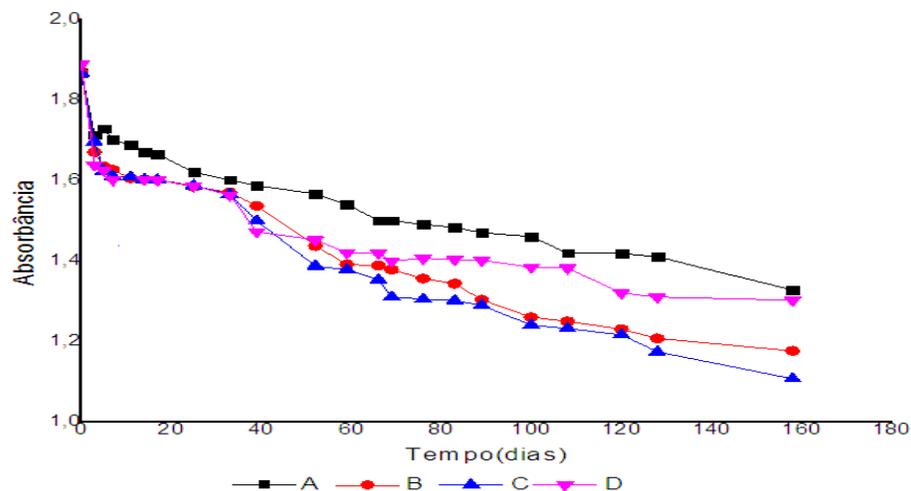


Figura 30 – Leituras de absorvância de antocianinas com adição de ácido ferúlico em tempo (dias). B = controle pH 2,0 temperatura ambiente no escuro: C = teste (0,5:1 p/v) temperatura ambiente no escuro: D = teste (0,8:1 p/v) temperatura ambiente no escuro: E = teste(1:1 p/v) temperatura ambiente no escuro.

Estabilidade com os tratamentos, à linha de cor preta B = controle pH 2,0 sem adição de ácido ferúlico em temperatura ambiente no escuro teve a maior absorvância em relação aos outros testes com um tempo de retenção de 69,74%, e um tempo de meia vida de 13,05 dias, e o experimento foi realizado até 160 dias com degradação das antocianinas dos cálculos (Tabela 13).

Tabela 13 – Retenção da cor (%R) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$), da mistura do extrato de antocianinas no resíduo de uva com adição de ácido ferúlico

Tratamento	controle	0,5:	0,8:1	1:1
R	69,74	62,89	59,32	69,01
$t_{1/2}$	13,35	9,82	8,73	12,26

Valores de absorvância das amostras de resíduo das antocianinas adicionado ácido ferúlico, cálculo referente a Tabela 5A do Apêndice.

Fonte: Katsaboxakis, Papanicolaou e Melanitou (1998).

A linha de cor vermelha com um tempo de retenção da cor de 62,89% com o tempo de meia vida de 9,82 dias na adição de ácido ferúlico com uma concentração de, C = teste (0,5:1 p/v), em temperatura ambiente no escuro,

houve a degradação das antocianinas lentamente tendo como efeito batocrômico. A linha de cor verde com um tempo de retenção de 59,32% e o tempo de meia vida foi de 8,73 dias com a adição de ácido ferúlico numa concentração de D = teste (0,8:1 p/v) temperatura ambiente no escuro, houve degradação das antocianinas lentamente, contemplando o efeito batocrômico. A linha de cor azul com o tempo de retenção de 69,01 e o tempo de meia vida foi de 12,26 dias, na adição de ácido ferúlico numa concentração E = teste (1:1 p/v) temperatura ambiente no escuro durante 160 dias de experimento, houve degradação maior em relação ao controle, sem adição do ácido ferúlico.

Em relação à análise realizada no HPLC, com antocianinas totais, foram adicionadas concentrações de ácido ferúlico (Figura 31).

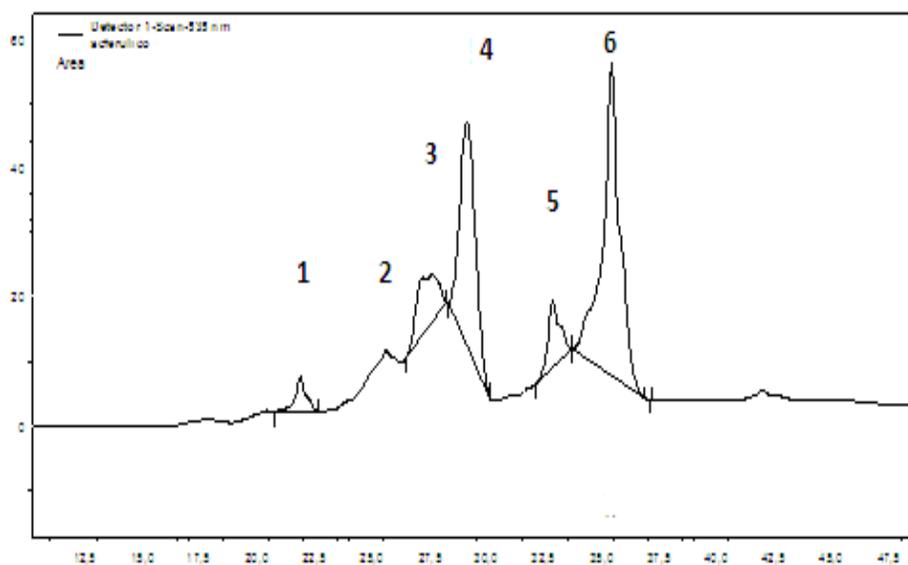


Figura 31 – Cromatograma de HPLC, de antocianinas no extrato da mistura de resíduo de uvas processadas, com adição de ácido ferúlico.

Na análise realizada no experimento da (Figura 30) a fim de verificar a estabilidade das antocianinas com concentrações de ácido ferúlico foram encontrados seis tipos de picos (Figura 31) por comparação com o tempo de retenção das antocianinas da (Tabela 5), o tempo de retenção de maior intensidade, foram Cianidina 3-glicosídeo e Peonidina 3-glicosídeo.

Os outros tempos de retenção foram analisados e estão expressos na (Tabela 14).

Tabela 14 – Comparação do tempo de retenção em relação a uvas vermelhas, da (Tabela 5) cromatograma de HPLC da (Figura 31), do resíduo da mistura (80% da uva Isabel e 20% da uva Bordô) na adição de ácido ferúlico

Pico	Tr (min)	Antocianinas
1	22,5	Delfinidina 3-glicosídeo
2	25,0	Peonidina 3, 5-diglicosídeo
3	27,5	Malvidina 3-glicosídeo
4*	29,0	Cianidina 3-glicosídeo
5	33,0	Petunidina 3-glicosídeo
6*	37,0	Peonidina 3-glicosídeo

Na Figura 1A do Apêndice, foi feito um cromatograma sobreposto no HPLC, no extrato de antocianinas no resíduo de bagaço de uva após o processamento, na adição de ácidos orgânicos: ácido ferúlico, e ácido cafeico. Os dois cromatogramas foram sobrepostos e mostram que os mesmos picos das Figuras anteriores não mudaram as suas características em relação à adição dos ácidos orgânicos.

5. CONCLUSÕES

Foi encontrado um teor de antocianinas de 25,6 mg/100 g, com uma recuperação de 52,5% de antocianinas totais, com solução extratora (70 mL de etanol 70% e 30 mL de HCl 0,1% em pH 2,0) no resíduo de uvas processadas que na sua composição tinha 80% da uva Isabel e 20% da uva Bordô, podendo ser reaproveitado nos diversos setores da indústria de alimentos, como corante natural.

E no estudo da estabilidade, foi utilizado ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico nas concentrações (0,5:1 p/v); (0,8:1 p/v); (1:1 p/v). Com um tempo de retenção 86,45%, tempo de meia vida de 31 dias, tempo de retenção 82,47% e tempo de meia vida em 15 dias, tempo de retenção 69,01%, o tempo de meia vida foi de 12 dias. O melhor ácido é p-cumárico e a melhor concentração, do ácido adicionado foi de (0,5:1 p/v), de antocianinas totais.

As antocianinas foram isoladas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), nas quais foram encontradas as seguintes antocianinas no resíduo de uvas processadas: Delfinidina 3-glicosídeo, Cianidina 3-glicosídeo, Petunidina 3-glicosídeo, Peonidina 3-glicosídeo, Peonidina 3-5-glicosídeo, Malvidina 3-glicosídeo.

REFERÊNCIAS

ALONSO, A. M. et al. Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, no. 21, p. 5832-5836-2002.

AMICO, V. et al. Constituientes of grape pomace from the Sicilian cultivar "Nerello Mascalese". **Food Chemistry**, London, v. 88, no. 4, p. 599-607, 2004.

ARTHEY, D.; ASHURST, P. R. **Fruit processing**: nutrition, products, and quality management. Gaithersburg: Aspen, 2001.

ARVANITOYANNIS, I. S.; LADAS, D.; MAVROMATIS, A. Potential uses and applications of treated wine waste: a review. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 41, no.5, p. 475-487, 2006.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, **Food Chemistry**, London, v. 99, no. 1, p.191-203, 2006.

BOYCE, S. J. Nitrogenous excretion in the antarctic penguin. **Journal of fish Biology**, Cambridge, v. 54, no.1, p. 72-81, 1999.

BOULTON, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in color of red wine: a critical review. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 52, no. 2, p. 67-80, 2001.

BRASIL. Desafios da vitivinicultura brasileira. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 19, p. 67-90, 2004.

CAMPOS, L. **Obtenção de extratos de bagaço de uva Cabernet Sauvignon (Vitis vinifera)**: parâmetros de processo e modelagem matemática. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)-Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

COSTA, C. T.; HORTON, D.; MARGOLIS, S. A. Analysis of anthocyanins in food by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography. A**, Amsterdam, v. 881, no.1-2, p. 403-410, 2000.

DARÍAS-MARTÍN, J. Enhancement of red wine colour by pre-fermentation addition of copigments. **Food Chemistry**, London, v. 73, no. 2, p. 217-220, 2001.

ESPÍN, J. C. et al. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff, **Journal of Agricultural and Food chemistry**, Easton, v. 48, no. 5, p. 1588-1592, 2000.

FRANCIS, F. J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. **Cereal Foods World**, Minneapolis, v. 45, no. 1, p. 208-213, 2000.

GÖKTÜRK BAYDAR, N.; ÖZKAN, G.; ÇETIN, E. S. Characterization of grape seed and pomace oil extracts. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 58, n. 1, p. 29-33, 2007.

GRIS, E. F. et al. Avaliação do tempo de meia vida de antocianinas de uvas Cabernet Sauvignon em "Sorbet". **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 22, n. 2, p. 375-386, 2004.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000 - A historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 90, no. 7, p. 136-147, 2000.

HAGIWARA, A. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-16-phenylimidazol (4, 5-b) pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1, 2-dimethylhydrazine. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 171, no. 23, p. 17-25, 2001.

JU, Z. Y.; HOWARD, L. R. Effects of solvent and temperature pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, no. 18, p. 5207-5213, 2003.

KATSABOXAKIS, K.; PAPANICOLAOU, D.; MELANITOU, M. Stability of pigmented orange anthocyanins in model and real food system. **Italian Journal Food Science**, Pinerolo, v. 10, no. 1, p. 17-25, 1998.

KAPADIA, G. J. et al. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced Epstein virus early antigen activation by natural colorants. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 115, no. 1, p. 173-178, 1997.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetable – the millennium's health. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 36, p. 703-725, 2001.

KONG, J. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Photochemistry**, London, v. 64, p. 923-933, 2003.

LAUFENBERG, G.; HUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products (A) the upgrading concept, (B) practical implementation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 87, no. 2, p. 167-198, 2003.

- LUCZKIEWICZ, M.; CISOWSKI, W. The RP-HPLC. Analysis of Anthocyanins. *Chromatographia*. **Arch. Latin. Americano Nutr.**, v. 48, no. 5/6, p.334-358, 1998.
- MAGNIER, L. Utilisation des seus produits de la vigne dans l'alimentation animale. **Options méditerranéennes. Série Séminaires**, v. 1, p. 89-90, 1991.
- MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 24, n. 1, p. 59-82, 2006.
- MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMÍNIO, I. P. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008.
- MARQUES, P.; FETT, R.; BRIGHENTE, I. Influência da copigmentação no extrato bruto do jambolão (*Eugenia jambolona* Lamarck). In: SIMPÓSIO EM **CIÊNCIA DE ALIMENTOS**, ALIMENTOS & SAÚDE, 1., 2001, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2001. p. 141.
- MATEUS, N. et al. Grape and wine polyphenolic composition of red *Vitis vinifera* varieties concerning vineyard altitude. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 3, n. 2, p. 102-110, 2001.
- MATTIVI, F. et al. Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, no. 20, p. 7692-7702, 2006.
- MELLO, L. M. R. **Mercado brasileiro de uvas e vinhos**. Bento Gonçalves: Embrapa/CNPUV, 2000. (Instrução técnica, 001).
- MELLO, L. M. R. **Vitivinicultura brasileira: panorama 2006**. Bento Gonçalves: Embrapa/CNPUV, 2007. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br>>. Acesso em: 4 abr. 2007.
- MELLO, L. M. R. **Vitivinicultura brasileira: panorama 2007**. Bento Gonçalves: **Embrapa/CNPUV**, 2008. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br>>. Acesso em : 2009.
- MORAIS, H. et al. Influence of sotrage conditions of monomeric anthocyanins studied by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 770,n.1, p. 297-301, 2002.
- MUÑOZ-ESPADA, A. C. et al. Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of Concord, Norton, and Marechal Foch grapes and wines. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 22, p. 6779-6786, 2004
- NEGRO, C.; TOMANASI, L.; MICELI, A. Phenolic compounds and antioxidante activity from red grape marc extracts. **Bioresource Techonology**, Essex, v. 87,no. 1, p. 41-44,2003.

NIXDORF, S. L.; GUTIÉRREZ, I. H. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel; Phenolic composition and antioxidant capacity. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 659, no. 1, p. 208-215, 2010.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A.; MELO, L. M. R. **A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas**. 2005. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/vitivinicultura.html>>. Acesso em: set 2005.

PROVENZI, G. et al. Estabilidade de antocianinas de uvas Cabernet Sauvignon com β -e γ -ciclodextrinas. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 9, n. 3, p. 165-170, 2006.

RAMIREZ-TORTOSA, C. et al. Anthocyanin rich extract decreases índices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin e-depleted rats. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 31, no. 9, p. 1033-1037, 2001.

ROBERTO, S. R.; GENTA, W. Panorama da viticultura paranaense. In: KISHINO, A. Y.; CARVALHO, S. L. C.; ROBERTO, S. R. **Viticultura tropical: o sistema de produção do Paraná**. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, 2007. p. 45-51.

SCHIEBER, A.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds-recent developments. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 12, n. 11, p. 401-413, 2002.

SEERAM, N. P. et al. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry, estrtracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, no. 25, p. 9329 -9339, 2006.

SILVA, L. R. **Aproveitamento de subprodutos da vinificação**. Viseu: ESAV, 2002.

SILVA, S.; MATIAS, A.; NUNES, A. Identification of flavonol glycosides in winemaking by-products by HPLC with different detectors and hyphenated with mass spectrometry. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, Runa, v. 20, n. 1, p. 178-33, 2005.

TERCI, D. B. L. **Aspectos analíticos e didáticos de antocianinas extraídas de frutas**. 2004. 213 f. Tese (Doutorado)-Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2004.

TORRES, M. A.; DANGL, J. L.; JONES, J. D. Arabidopsis, homologues are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in plant defense response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, D.C., v. 99, no.3, p. 517-522, 2002.

VANINI, L. S.; KWIATKOWSKI, A.; CLEMENTE, E. Extraction and stability of anthocyanins from the Benitaka grape cultivar (*Vitis vinifera* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 12, no. 3, p. 213-219, 2009.

WANG, C. J. et al. Protective effect of Hibiscus Anthocyanins Against tert-butyl Hydroperoxide induced Hepatic Toxicity in Rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 38, no. 5, p. 411-416, 2000.

WORSLTAD, R. E.; GIUSTI, M. M. Characterization and measurement of anthocyanins by uv-visible spectroscopy. In: CURRENT protocols in food analytical chemistry. New York: John Willey & Sons, 2001. Unit Ft.2.

XIANLI, W.; PRIOR, R. L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, no. 7, p. 2589-2599, 2005.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Tabela 1A – Temperaturas médias no período de 2000-2009 em graus Celsius

Mês/ano	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Janeiro	26,4	26,4	25,8	25,8	26,3	24,5	25,6	24,6	24,1	24,0
Fevereiro	25,2	25,7	25,6	26,1	26,2	25,9	24,3	25,0	24,5	25,4
Março	24,7	26,1	28,2	26,0	25,8	25,9	25,0	25,3	24,5	25,4
Abril	25,4	27,7	24,1	24,3	24,3	24,3	22,5	24,0	22,2	25,4
Maio	20,0	19,6	21,8	20,1	17,6	21,5	18,4	19,1	18,9	20,4
Junho	20,8	18,5	22,8	22,0	18,6	20,9	19,4	20,0	17,6	16,5
Julho	16,5	20,4	19,1	21,1	18,3	17,6	20,5	17,6	20,4	17,7
Agosto	21,0	22,8	23,3	19,2	22,0	21,4	21,2	20,7	20,8	-
Setembro	21,7	23,0	22,3	22,7	25,8	19,3	20,1	24,6	20,2	-
Outubro	26,6	24,9	26,9	24,5	22,8	19,3	24,1	25,0	23,8	-
Novembro	25,2	25,5	24,8	25,5	24,7	24,5	24,7	23,7	24,1	-
Dezembro	25,6	25,0	26,8	25,7	25,5	24,6	25,3	25,1	25,6	-
Média	23,17	23,60	24,56	23,56	23,15	22,82	22,60	22,90	22,20	-

Fonte: Estação Climatológica da UEM (agosto de 2009).

Tabelas 2A – Médias mensais pluviométricas no período de 2000-2009

Mês/ano	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Janeiro	242,8	216,9	310,7	309,9	53,1	326,5	169,0	271,9	117,5	264,7
Fevereiro	278,4	217,0	116,8	219,8	96,5	16,1	179,0	207,4	134,6	252,8
Março	130,3	146,9	39,9	168,1	152,2	64,7	281,0	150,0	126,6	97,5
Abril	32,0	70,1	8,0	100,2	105,4	93,0	240,0	63,90	172,2	50,8
Maio	37,8	166,5	346,3	62,7	274,8	55,7	87,0	51,40	81,5	111,5
Junho	106,6	122,5	2,4	58,7	101,6	63,0	11,70	7,80	46,3	181,5
Julho	73,50	36,7	64,5	46,7	128,2	66,0	27,0	227,9	79,0	-
Agosto	160,0	152,6	59,9	75,2	0,4	0	53,0	14,02	19,8	-
Setembro	189,9	106,5	167,7	109,8	67,0	247,0	271,0	31,70	78,80	-
Outubro	252,5	78,5	63,6	106,9	345,6	232,0	95,70	105,4	112,4	-
Novembro	239,2	151,8	358,8	112,1	231,0	117,0	86,40	171,4	182,7	-
Dezembro	178,3	255,0	201,2	137,4	158,8	82,0	238,4	235,0	85,8	-
Média	1921,3	1721,0	1748,5	1507,5	1714,6	1363,0	1561,61	537,4	1366,1	958,7

Fonte: Estação Climatológica da UEM (agosto de 2009).

Tabela 3A – Médias mensais de evaporação no período de 2006-2008

Mês/ano	2006	2007	2008
Janeiro	126,5	71,4	103,7
Fevereiro	84,6	95,5	103,7
Março	122,2	123,5	122
Abril	113,8	119,9	95
Maio	122	118	106,5
Junho	131,6	134,9	79,3
Julho	157	125,3	153,4
Agosto	197,7	170	135
Setembro	146,8	216	165,9
Outubro	137,3	184,2	137,5
Novembro	143,4	146,6	138,1
Dezembro	121,5	141,2	171,2
Média	1604,4	1643,7	1511,3

Fonte: Estação Climatológica da UEM (agosto de 2009)

Tabela 4A – Umidade relativa do ar % no período de 2006-2009

Mês/ano	2006	2007	2008	2009
Janeiro	72	84	77	84
Fevereiro	80	75	77	62
Março	75	70	70	64
Abril	72	70	74	69
Maio	66	70	70	65
Junho	64	62	76	72
Julho	60	65	59	67
Agosto	54	56	63	55
Setembro	65	61	59	71
Outubro	69	61	68	76
Novembro	66	66	66	65
Dezembro	75	69	61	69
Média	68	67	68	68

Fonte: Estação Climatológica da UEM (agosto de 2009)

Tabela 5A – Absorbância por espectrofotometria UV-Vis na adição de concentrações do ácido ferúlico, em temperatura ambiente e sem luz

Dias	Amostra sem adição	Amostra com adição de 0,5: 1 p/v	Amostra com adição de 0,8: 1 p/v	Amostra com adição de 1:1 p/v
0	1,867	1,870	1,866	1,888
03	1,712	1,670	1,695	1,638
05	1,728	1,634	1,623	1,625
07	1,701	1,626	1,610	1,602
11	1,688	1,605	1,608	1,068
14	1,670	1,602	1,602	1,602
17	1,665	1,601	1,601	1,600
25	1,620	1,584	1,587	1,586
33	1,600	1,570	1,565	1,563
39	1,587	1,536	1,499	1,472
52	1,566	1,437	1,387	1,452
59	1,540	1,391	1,378	1,420
66	1,500	1,388	1,353	1,419
69	1,500	1,378	1,310	1,400
76	1,490	1,356	1,305	1,406
83	1,483	1,343	1,301	1,403
89	1,470	1,303	1,289	1,401
100	1,460	1,260	1,240	1,384
108	1,419	1,249	1,232	1,382
120	1,418	1,230	1,216	1,320
128	1,410	1,207	1,174	1,310
158	1,327	1,176	1,107	1,302

Tabela 6A – Absorbância por espectrofotometria UV-Vis na adição de concentrações do ácido p-cumárico, em temperatura ambiente e sem luz

Dias	Amostra sem adição do ácido	Amostra com adição de 0,5: 1 p/v	Amostra com adição de 0,8: 1 p/v	Amostra com adição de 1:1 p/v
0	0,481	0,310	0,386	0,320
03	0,356	0,317	0,321	0,317
05	0,334	0,323	0,335	0,321
07	0,328	0,339	0,323	0,327
11	0,279	0,277	0,278	0,291
14	0,302	0,317	0,320	0,314
17	0,280	0,303	0,303	0,326
25	0,263	0,288	0,288	0,297
33	0,254	0,276	0,278	0,285
39	0,248	0,309	0,277	0,285
52	0,241	0,299	0,275	0,292
59	0,231	0,266	0,261	0,297
66	0,277	0,268	0,257	0,302
69	0,280	0,281	0,261	0,278
76	0,299	0,286	0,261	0,298
83	0,294	0,290	0,257	0,289
89	0,273	0,290	0,255	0,283
100	0,272	0,266	0,256	0,289
108	0,269	0,270	0,255	0,286
120	0,256	0,271	0,248	0,286
128	0,244	0,272	0,246	0,287
155	0,238	0,268	0,246	0,282

Tabela 7A – Absorbância por espectrofotometria UV-Vis na adição de concentrações do ácido cafeico, temperatura ambiente e sem luz

Dias	Amostra sem adição de ácido	Amostra com adição de (0,5: 1 p/v)	Amostra com adição de (0,8: 1 p/v)	Amostra com adição de (1:1 p/v)
0	0,412	0,519	0,615	0,688
5	0,410	0,465	0,487	0,512
8	0,412	0,468	0,478	0,514
15	0,393	0,453	0,477	0,505
22	0,382	0,450	0,457	0,503
28	0,384	0,450	0,453	0,505
39	0,377	0,455	0,450	0,502
47	0,363	0,440	0,449	0,493
54	0,360	0,438	0,447	0,490
64	0,358	0,434	0,437	0,491
77	0,351	0,434	0,433	0,490
87	0,345	0,437	0,425	0,489
100	0,340	0,428	0,422	0,479

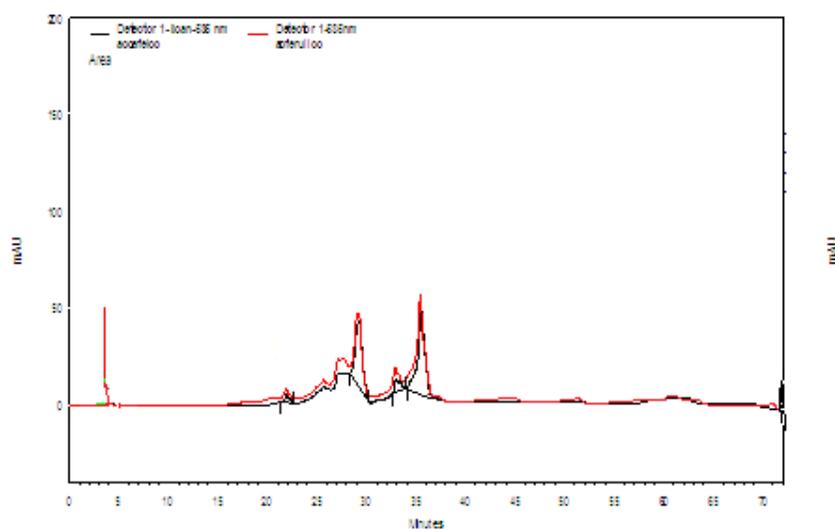


Figura 1A – Cromatograma sobreposto de HPLC, de antocianinas no resíduo de uva após o processamento, com adição de ácido orgânico ferúlico, e ácido orgânico cafeico.

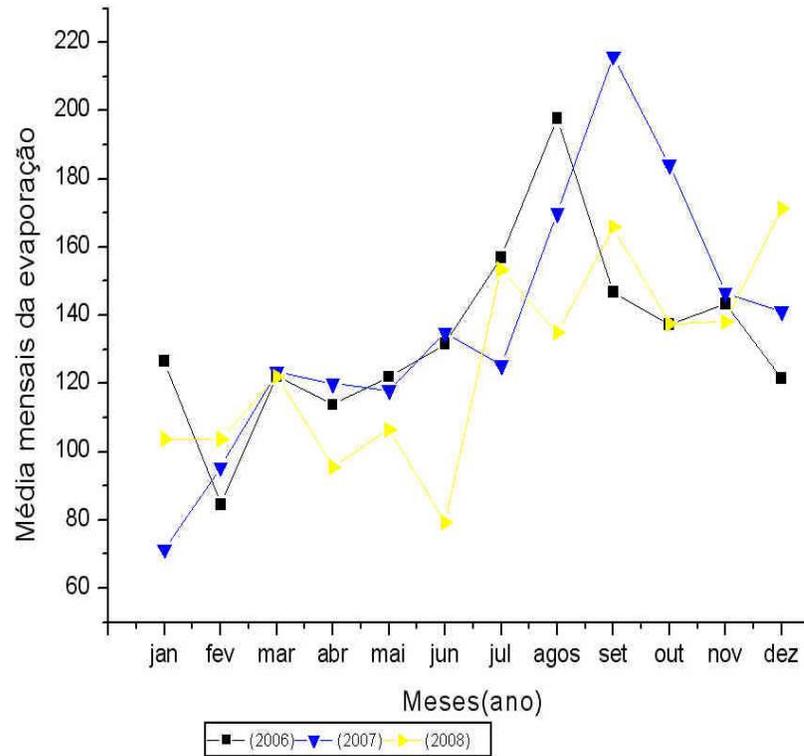


Figura 2A – Médias mensais da evaporação durante últimos três anos da região de Maringá-PR.

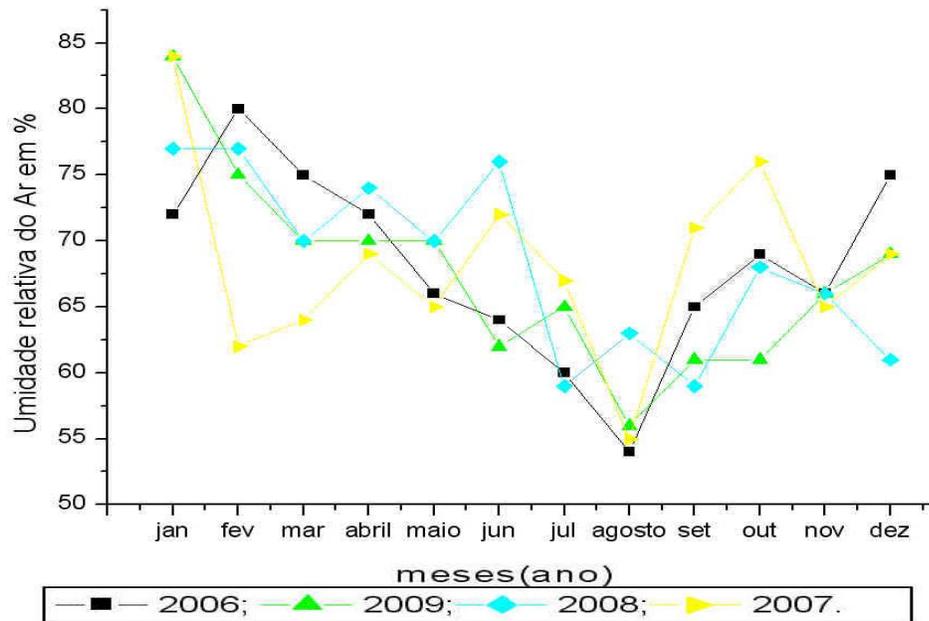


Figura 3A – Umidade relativa do ar em %, referente aos meses do ano, durante últimos quatro anos da região de Maringá-PR.