

AVALIAÇÃO DE SISTEMAS SOLVENTES NA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE RESÍDUOS DE UVAS TINTAS

Roseane S. Oliveira¹, Gabriele de Abreu Barreto¹, Carlos A. B. C. Silva², Marcelo
A. Umsza-Guez³, Bruna A. S. Machado¹

¹SENAI – Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial, E-mail: rosesolliveira@gmail.com,
abreugabriele@gmail.com, brunam@fiieb.org.br.

²Diretor de Pesquisa, Consulado do Vale, Petrolina/PE, E-mail: consuladodovale@gmail.com

³UFBA – Universidade Federal da Bahia, E-mail: paraumsza@hotmail.com

RESUMO

O aproveitamento de resíduos agroindustriais, potencialmente ricos em substâncias de alto valor nutricional e funcional, tem mostrado ser uma alternativa promissora no que diz respeito à recuperação de compostos bioativos. O objetivo do trabalho foi realizar caracterização fitoquímica de resíduo de uvas tintas da variedade Syrah utilizando dois tipos de solventes extratores. O resíduo de uvas, constituído de cascas e sementes, foi cedido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Petrolina (PE) e mantido sob congelamento. Para os ensaios foi elaborado um extrato do resíduo com solvente na proporção 1:5. As análises de compostos fenólicos totais e flavonoides foram realizadas em espectrofotômetro com base na curva padrão de ácido gálico e quercetina, respectivamente. A determinação da atividade antioxidante por DPPH também foi realizada em espectrofotômetro. A concentração de fitoquímicos nos resíduos de uvas para o solvente etanol 95% e metanol 99%, respectivamente, foi de 334,246±0,005 e 550,684±0,020 mg EAG/g para o conteúdo de compostos fenólicos; 3,624±0,004 e 7,217±0,004 mg EQ/g para o teor de flavonoides; e foi observado o conteúdo de 0,492±0,003 e 0,729±0,006 mg/g para o conteúdo de antocianinas. O valor de CE50, concentração efetiva de extrato que neutraliza 50% dos radicais livres, para o resíduo da variedade Syrah foi de 2,403±0,075 mg/g para o extrato etanólico e para o metanólico obteve-se o valor de 0,657±0,124 mg/g.

Palavras-chaves: *compostos fenólicos; flavonoides; antocianinas; atividade antioxidante; Vitis vinífera L.*

ABSTRACT

The use of agricultural residues, potentially rich in substances of high functional and nutritional value, has been shown to be a promising alternative in respect to recovery of bioactive compounds. The objective was carry out phytochemical characterization of residue of grapes of Syrah variety using two types of extracting solvents. The residue of grapes, consisting of skins and seeds, was ceded by the Brazilian Agricultural Research Corporation - Petrolina (PE) and kept under freezing. For the tests it designed a residue extract solvent in the ratio 1:5. The analysis of phenolic compounds and flavonoids were carried out in a spectrophotometer based on the standard curve of gallic acid and quercetin, respectively. Determination of antioxidant activity by DPPH was also performed in a spectrophotometer. The concentration of phytochemicals in grapes residues to the solvent ethanol 95% and methanol 99% respectively, was 334.246 ± 550.684 ± 0.005 and 0.020 mg GAE / g for the

content of phenolic compounds; 3.624 ± 0.004 and 7.217 ± 0.004 mg EQ / g for flavonoid content; and it noted the contents of 0.492 ± 0.003 and 0.729 ± 0.006 mg / g for the content of anthocyanins. The EC50 value, effective concentration extract that neutralizes 50% of free radicals to the residue variety Syrah was 0.075 ± 2.403 mg / g for the ethanol extract and the methanol there was obtained a value of 0.657 ± 0.124 mg / g.

Keywords: *phenolic compounds; flavonoids; anthocyanins; antioxidant activity; Vitis vinifera L.*

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de uva é uma das atividades mais importantes no cenário agrícola mundial, possuindo destaque tanto na economia, quanto a nível nutricional e fitoquímico. A viticultura brasileira apresenta grande diversidade, no Nordeste, a região do Vale do São Francisco se destaca como polo produtor e exportador de uvas de alta qualidade [1], além de ser capaz de produzir mais de duas safras por ano [2].

A uva contém vários elementos, tais como vitaminas, minerais, hidratos de carbono, fibras alimentares e fitoquímicos. A importância nutricional das uvas e dos produtos obtidos, como sucos, vinho, uva, geleias e passas têm sido relatadas constantemente [3]. A correlação direta entre ingestão de uvas e vinhos com benefícios na saúde é devido a grande quantidade de compostos fenólicos presentes nessa fruta, que apresentam significativo poder antioxidante [4].

Dentre os diversos resíduos gerados pela agroindústria, os vinícolas destacam-se por serem fontes ricas em compostos fenólicos [5]. O processamento da uva gera grande quantidade de resíduos, cerca de 30% do volume de uvas utilizadas, que embora seja biodegradável, exige um tempo mínimo para ser mineralizado, constituindo-se numa fonte de poluentes ambientais [6,7]. Estima-se que, aproximadamente, a cada 100 litros de vinho produzidos, no mundo, sejam gerados de 25 a 31 kg de resíduos. Do total de resíduo produzido, cerca de 13 a 17 kg são constituídos de bagaço, sendo por isso, referenciado com o principal resíduo do processamento da uva [8,9]. Com a grande quantidade de subprodutos e resíduos gerados, existe um interesse crescente no aproveitamento desses produtos como culturas industriais, tanto por razões econômicas quanto por preocupações ambientais [10,11].

A utilização do bagaço da uva e dos seus componentes tem um impacto ambiental importante na redução do lixo, e possibilidades para elaboração de produtos com alto valor agregado. A biomassa residual de uvas que foram beneficiadas pode ser uma matéria-prima barata e valiosa para a recuperação de compostos polifenólicos biologicamente interessantes e produtos a base desses compostos.

O bagaço de uva é constituído de cascas, talos ou hastes e sementes, que apresentam teores significativos de compostos fenólicos, sendo os principais os flavonóides (antocianinas, flavanóis e flavonóis), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos) e uma larga variedade de taninos [12,13]. Estes compostos bioativos

possuem propriedades antioxidantes, como a inibição de lipoperoxidação e a atividade antimutagênica, além de atuarem como antagonistas naturais de patógenos, dessa forma podem exercer um importante papel fisiológico, minimizando os danos oxidativos no organismo animal [14,7].

A potente atividade antioxidante de extratos de vinho e uva no controle da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade in vitro foram correlacionadas significativamente com a ação dos compostos fenólicos contidos nas amostras, principalmente, na casca da uva [15,16].

Diversos estudos buscam a aplicabilidade de resíduos oriundos do processamento da uva, principalmente com o objetivo de aumentar o aporte de componentes bioativos em produtos alimentícios [17,18]. Pesquisas nas áreas alimentícias, farmacêutica, médica e agrônômica têm revelado grande potencial do resíduo de uva para recuperação de compostos fenólicos e flavonoides, uma vez que, são comprovados nessas pesquisas, benefícios associados a sua ingestão, como melhoria a tolerância à glicose em diabéticos, diminuição da ocorrência de doenças cardiovasculares, atenuação dos sintomas da menopausa, proteção contra a osteoporose, câncer e mal de Alzheimer.

Os recentes estudos científicos têm sido voltados para o emprego de resíduos oriundos do processamento de alimentos [19, 20, 21]. O conteúdo de compostos bioativos obtidos de resíduos alimentícios apresenta grande potencial para incorporação em gêneros alimentícios, podendo oferecer um caráter funcional a produtos originalmente pobres nesses compostos, característica importante quando se trata do estímulo à busca por estilo de vida saudável.

A extração destes compostos polifenólicos em matérias vegetais tem sido realizada com diversos solventes e diferentes métodos, sendo que o rendimento da extração é influenciado tanto pelo solvente utilizado como pelo método aplicado [22, 23, 24]. Sendo assim, o presente trabalho objetivou realizar caracterização fitoquímica de resíduo de uvas tintas da variedade *Syrah* utilizando diferentes solventes extratores, etanol e metanol.

2. METODOLOGIA

Para o estudo foram utilizados resíduos de uvas tintas da variedade *Syrah* gerados pela industrialização da uva, da região do Vale Submédio do São Francisco. As uvas e os resíduos de vinícolas foram transportados para o laboratório experimental, onde foram mantidas sob temperatura de congelamento até a realização dos procedimentos experimentais.

Elaboração do extrato

Para os ensaios foi elaborado um extrato a partir do resíduo, que foi diluído com solvente na proporção 1:5, em seguida foi agitado por 60 minutos a 55°C em incubadora tipo *shaker*, centrifugado por 10 minutos, filtrado com filtros de papel (80g/m²) e deixados em estufa a 55°C até peso constante. As soluções para as análises fitoquímicas foram preparadas com etanol 95% e metanol a 99%, tendo como concentração final 5mg/mL.

Determinação dos compostos Fenólicos Totais.

O teor de fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu [25]. Preparou-se a reação em tubo de ensaio contendo uma alíquota de 0,5mL da amostra concentrada a 1mg/mL, 2,5mL de solução aquosa de Folin-Ciocalteu (10%) e 2,0mL de carbonato de sódio (7,5%). Os tubos foram aquecidos em banho-maria a 50°C durante 5 minutos e por seguinte foi realizada a leitura em espectrofotômetro em absorvância de 765nm. A quantificação dos fenólicos totais se deu a partir da curva padrão de soluções conhecidas do padrão ácido gálico e expressa em equivalente de ácido gálico (mg de ácido gálico em g de extrato).

Determinação do teor de Flavonoides Totais

A análise foi feita em espectrofotômetro a 415nm, utilizando-se 3mL de cloreto de alumínio a 2% diluído em metanol [26] e 3mL das amostras. O mesmo procedimento foi realizado utilizando soluções conhecidas do padrão quercetina para a elaboração da curva padrão e a quantidade de flavonoides totais foi expressa como equivalentes de quercetina (mg de quercetina em g de extrato).

Antocianinas

A extração das antocianinas dos resíduos de uva *Syrah* foi realizada conforme metodologia descrita na literatura [27]. Cerca de 0,5g da amostra foi pesada em erlenmeyer e por seguinte foram adicionados 30mL da solução extratora (etanol 95% - HCl 1,5N e metanol 95% - HCl 1,5N) na proporção 85:15. As amostras repousaram por 12h a 4°C. Após o tempo transcorrido, filtrou-se o conteúdo para um balão volumétrico de 100mL, envolto com papel alumínio, aferindo-se com a própria solução extratora, deixou-se descansar por 2h em temperatura ambiente antes da leitura feita por espectrofotometria a 535nm.

Determinação da capacidade anti-radical (DPPH)

A mensuração da atividade antioxidante foi pelo método DPPH [28] utilizando-se o reativo 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, usado como radical livre com o objetivo de reagir com os compostos antioxidantes presentes nas amostras. Cinco diluições foram preparadas (0,6 a 2,2mg/mL) das soluções etanólica e metanólica, em triplicata. Uma alíquota de 1mL de cada diluição da amostra foi transferida para tubos de ensaio com 3,0mL da solução etanólica radical DPPH (0,004%). Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, a redução do radical livre DPPH foi quantificada pela leitura da absorvância em 517nm. O mesmo procedimento foi adotado com os solventes (etanol e metanol) no lugar da amostra, sendo considerado como branco. A capacidade de sequestrar radical livre foi expressa por percentual de inibição de oxidação do radical e calculada conforme a Equação (01).

$$\% \text{ sequestro} = 100 - \frac{(\text{absorbância final da amostra} \cdot 100)}{\text{absorbância branco}} \quad (01)$$

Além da porcentagem de inibição de oxidação do radical, foi calculada a concentração efetiva necessária para o sequestro de 50% do DPPH (EC50).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas encontrados para o resíduo de uva *Syrah* encontram-se na Tabela 1. Os compostos fenólicos são fitoquímicos com alta capacidade antioxidante e eficazes na redução de radicais livres, através de mecanismos de inibição de enzimas responsáveis pela produção e redução de espécies reativas de oxigênio [29]. Os compostos fenólicos, em razão das suas características, podem ser extraídos de uma matriz utilizando solventes polares, entretanto, é fundamental definir adequadamente o solvente de extração de acordo com a matriz utilizada [14].

Tabela 1 – Média±desvio padrão da quantificação de compostos de fenólicos (mg de equivalente de ácido gálico/g), flavonoides (mg de equivalente de quercetina/g) e antocianinas totais (mg/g) de resíduos de uvas da variedade *Syrah*.

Amostra	Fenólicos (mgEAG/g)	Flavonoides (mgEQ/g)	Antocianinas (mg/g)
Resíduo <i>Syrah</i> EtOH	334,246±0,005	3,624±0,004	0,492±0,003
Resíduo <i>Syrah</i> MetOH	550,684±0,020	7,217±0,004	0,729±0,006

*Desvio padrão referente às absorvâncias obtidas.

A amostra de resíduo avaliado apresentou maior teor de compostos fenólicos utilizando solvente metanólico, 550,684 mg EAG/g, enquanto que a extração com o etanol resultou num teor de 334,246 mg EAG/g. É possível encontrar na literatura conteúdo de compostos fenólicos em uvas tinta inferiores ao encontrado nesta pesquisa, com aplicação de diferentes sistemas solventes para a extração. Llobera e Cañellas [30], relataram teores médios de 26,3 mg EAG/g em peso seco, utilizando metanol a 50% para extrair compostos fenólicos do bagaço de uvas tintas da variedade *Manto Negro*. Negro et al. [21], pesquisaram os resíduos da vinificação de uva da variedade *Negro Amaro*, com extração a partir do etanol a 80% acidificado, e encontraram teor de compostos fenólicos de 41,9 mg EAG/g em peso seco no bagaço. A diferença nos valores pode estar relacionada com as variações no método de extração utilizado e a heterogeneidade das estruturas químicas dos compostos das variedades estudadas.

Os flavonoides são os principais compostos fenólicos presentes na uva, que compreendem as antocianinas e flavonóis [13]. O teor de flavonoides encontrado na amostra de resíduos de uvas foi de 7,217 mg EQ/g empregando o solvente metanol e 3,624 mg /g utilizando o etanol. De forma concordante, Silva et al. [31] encontraram 1,60 mg EQ/g do conteúdo de antocianinas totais para a casca da variedade *Alicante*, utilizando solução extratora etanol 95%, acidificada com HCl 1,5 N.

O teor de antocianinas, presentes no resíduo de uvas estudado, apresentou valores de 0,729 e 0,492 mg/g, para o extrato metanólico e etanólico, respectivamente, indicando a maior eficiência do metanol na extração deste flavonoide. De acordo com Malacrida [32] o teor de antocianinas encontrado em uvas tintas maduras variam de 0,30 a 7,50 mg/g. Kato et al. [33], encontraram valores próximos para uvas da cv. Bordô, uma faixa de 0,143 a 0,978 mg/g de antocianinas, utilizando etanol 70% como solvente extrator em diferentes faixas de pH.

O conteúdo de antocianinas se relaciona com a capacidade antioxidante da uva, quanto mais intensa a coloração maior será o potencial funcional, logo as uvas de coloração escura apresentam maior conteúdo de compostos fenólicos e maior capacidade antioxidante [4]. A concentração destes compostos é influenciada por diversos fatores, pois a composição química da uva varia, principalmente, em função do clima, solo, variedade e cultivar.

A atividade antioxidante e a porcentagem de sequestro de radicais livres para os extratos de resíduos de uvas da variedade *Syrah* são apresentados na Tabela 2. A variação da atividade antioxidante foi expressiva em relação ao tipo de solvente utilizado no experimento. O percentual de atividade antioxidante foi mais elevado utilizando solução extratora a partir de metanol, resultando num sequestro de radicais livres duas vezes superior ao etanol nas mesmas concentrações. Mello [34] pesquisou a composição química de extratos aquosos de resíduos provenientes da produção vinícola, e encontrou para os resíduos de *Cabernet Sauvignon* e *Moscato* percentuais superiores a 90 % de atividade antioxidante.

Tabela 2 - Porcentagem de sequestro dos radicais livres de DPPH (%)±desvio padrão*.

Concentração mg/mL	Resíduo <i>Syrah</i> EtOH	Resíduo <i>Syrah</i> MetOH
2,2	47,366±0,008	81,666±0,005
1,8	41,646±0,005	80,555±0,023
1,4	35,843±0,006	72,906±0,005
1,0	29,588±0,006	60,384±0,008
0,6	24,115±0,008	43,717±0,006

*Desvio padrão referente às absorvâncias obtidas.

O valor de CE50 representa a concentração efetiva de extrato que sequestra 50% dos radicais livres. Para as amostras solubilizadas com etanol, o EC50 encontrado foi de 2,403±0,075 mg/g e para as metanólicas obteve-se o valor de 0,657±0,124 mg/g. Desta forma, a solubilidade dos compostos antioxidantes em meio metanólico foi superior ao em meio etanólico, visto que quanto menor o EC50 melhor será a atividade antioxidante do composto analisado.

4. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou a influência dos diferentes sistemas solventes empregados na extração de compostos bioativos dos resíduos de uvas tintas da variedade *Syrah*. Os teores detectados de compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas foram mais expressivos com o uso do solvente metanol, que apresentou maior capacidade extratora destes compostos bioativos em resíduos de uvas. O uso do sistema solvente metanol resultou em teores de compostos fitoquímicos mais elevados em cerca de 40%, quando comparados com os conteúdos obtidos utilizando o solvente etanol.

Sugere-se que outros estudos sejam desenvolvidos, utilizando distintos sistemas solventes, para avaliar o comportamento extrator em resíduos de uvas.

5. REFERÊNCIAS

¹Grangeiro, L. C.; Leão, P. C. S.; Soares, J. M. Caracterização fenológica e produtiva da variedade de uva superior seedless cultivada no vale do São Francisco. *Revista Brasileira de Fruticultura* **2002**, *24*, 552-554.

²Camargo, R. B.; Peixoto, A. R.; Terao, D.; E. O. Ono, Leonardo Sousa Cavalcanti. Fungos causadores de podridões pós-colheita em uvas apirênicas no pólo agrícola de Juazeiro-BA e Petrolina-PE. *Revista Caatinga* **2011**, *24*, 15-19.

³Djilas, S.; Čanadanović-Brunet, J.; Četković, G. By-products of fruits processing as a source of phytochemicals. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* **2009**, *15*, 191-202.

⁴Abe, T. L.; Mota, R. V.; Lajolo, F. M.; Genovese, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* e *Vitis vinifera* L. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2007**, *27*, 394-400.

⁵Rubilar, M.; Pinelo, M.; Shene, C.; Sineiro, J.; Nuñez, M. J. Separation and HPLC-MS identification of phenolic antioxidants from agricultural residues: almond hulls and grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 10101-10110.

⁶Makris, D. P.; Boskou, G.; Andrikopoulos, N. K. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* **2007**, *20*, 125-132.

⁷Cataneo, C. B.; Caliar, V.; Gonzaga, L. V.; Kuskoski, E. M.; Fett, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. *Semina: Ciências Agrárias* **2008**, *29*, 93-102.

⁸Costa, J. E.; Belchior, A. P. Elaboração e utilização dos produtos secundários da vinificação. Relatório nacional, Lisboa, **1972**.

⁹Costa, J. M. Aproveitamento de subprodutos da vinificação. O bagaço como matéria prima da indústria de óleos e grainha e de fabrico de rações para gado. In: 1º Congresso Nacional das Indústrias Agro-Alimentares, **1983**.

¹⁰Spigno, G.; Pizzorno, T.; Faveri, D. M. Cellulose and hemicelluloses recovery from grape stalks. *Bioresourch Technology* **2008**, *99*, 4329-4337.

¹¹Prozil, S. O.; Evtuguin, D. V.; Lopes, L. P. C. Chemical composition of grape stalks of *Vitis vinifera* L. from red grape pomaces. *Industrial Crops and Products* **2012**, *35*, 178-184.

¹²Cabrita, M. J.; Silva, J. R.; Laureano, O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. I Seminário Internacional De Vitivinicultura, México, **2003**.

¹³Francis, F. J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. *Cereal Foods World* **2000**, *45*, 208-213.

¹⁴Souquet, J-M. Phenolic composition of grape stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 1076-1080.

¹⁵Teissedre, P. L.; Walzem, A. L.; R. L.; German, J. B.; Frankel, E. N.; Clifford, A. J. Composés phénoliques du raisin et du vin et santé. *Bulletin de l'OIV* **1996**, *69*, 781-82, 251-27.

¹⁶Tomera, J. F. Current knowledge of the health benefits and disadvantages of wine consumption. *Trend in Food Science Technology* **1999**, *10*, 129-138.

¹⁷Määttä-Riihinen, K. R.; Kamal-Eldin, A.; Mattila, P. H.; González-Paramás, A. M.; Törrönen, A. R. Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 4477-4486.

¹⁸Pinelo, M.; Rubilar, M.; Jerez, M.; Sineiro, J.; Núñez, M. J. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 2111-2117.

¹⁹Gruz, A. P. G.; Sousa, C. G. S. E.; Torres, A. G.; Freitas, S. P.; Cabral, L. M. C. Recuperação de compostos bioativos a partir do bagaço de uva. *Revista Brasileira de Fruticultura* **2013**, *35*, 1147-1157.

²⁰Pozza, M. S. V.; Braga, G. C.; Salibe, A. B. Teores de antocianinas, fenóis totais, taninos e ácido ascórbico em uva 'bordô' sobre diferentes porta-enxertos. *Revista Ceres* **2012**, *59*, 701-708.

²¹Negro, C.; Tommasi, L.; Miceli, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology* **2003**, *87*, 41-44.

²²Teixeira, L. N.; Stringheta, P. C.; Oliveira, F. A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. *Revista Ceres* **2008**, *55*, 297-304.

²³Rockenbach, I. I.; Silva, G. L.; Rodrigues, E.; Kuskoski, E. M.; Fett1, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2008**, *28*, 238-244.

²⁴Camargo, A. G.; Pieretti, G. G.; Menegotto, R. S.; Jardim, C. D.; Coutinho, M. R. Estudo da extração de antocianinas do resíduo da fabricação de vinho caseiro. *Anais da SIEPE – Semana de Integração Ensino, Pesquisa e Extensão*, **2009**.

²⁵Singleton, V. L. & Rossi, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **1965**, *16*, 144-158.

²⁶Marcucci, M. C.; Woisky, R. G. & Salatino, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. *Mensagem doce* **1998**, *46*, 3-8.

- ²⁷Francis, F. J. Analysis of anthocyanins. In: Markakis, P. (ed.) Anthocyanins as food colors. New York: Academic Press, **1982**. 181-207.
- ²⁸Brand W. W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* **1995**, *28*, 25-30.
- ²⁹Fu, L.; Xu, B. T.; Xu, X. R.; Gan, R. Y.; Zhang, Y.; Xia, E. Q.; Li, H. B. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry* **2011**, *129*, 345-350.
- ³⁰Llobera, A.; Cañellas, J. Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. *Food chemistry* **2007**, *101*, 659-666.
- ³¹Silva, M. S.; Alves, R. E.; Silva, S. M.; Coelho, M. A. L. Quantificação de antocianinas totais determinadas na casca e na polpa de uvas tintas destinadas à produção de vinhos. In: Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE), **2011**.
- ³²Malacrida, R. C.; Motta, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. *Boletim do Ceppa* 2006, *24*, 59-82.
- ³³Kato, C. G.; Tonhi, C. D.; Clemente, E. Antocianinas de uvas (*Vitis vinifera* L.) produzidas em sistema convencional. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial* **2012**, *6*, 809-821.
- ³⁴Melo, P. S. Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, **2010**.