

Sandia Santos Machado

**QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E
COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVINÍCOLAS
POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO**

**Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao
Grau de Mestre em Controlo de Qualidade**

**Trabalho realizado sob orientação do
Professor Doutor João Almeida Lopes**

Julho de 2015

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO/TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

RESUMO

A indústria vitivinícola é conhecida por produzir uma grande quantidade de resíduos sendo a sua eliminação problemática, pois além de apresentarem toxicidade para o meio ambiente, não existem muitas aplicações onde possam ser empregues. Contudo, estes resíduos são ricos em compostos antioxidantes e a sua extração e reutilização apresenta-se como uma boa alternativa. Como tal, é necessário desenvolver um método rápido, simples e de baixo custo para a avaliação dos compostos antioxidantes presentes nestes resíduos. A espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) apresenta todas estas características e além disso permite analisar vários parâmetros em simultâneo e ser aplicada *in-situ* e de forma não-destrutiva.

Este trabalho teve como objetivo a determinação da capacidade antioxidante total (CAT), compostos fenólicos totais (CFT) e composição dos resíduos vitivinícolas (quantidade de grainhas e películas) em amostras inteiras e moídas utilizando a espectroscopia NIR.

Foram construídos modelos baseados em espectros NIR de resíduos com o auxílio de ferramentas quimiométricas, nomeadamente o método dos mínimos quadrados parciais (PLS). O desempenho dos modelos para prever os parâmetros estudados foi avaliado através do erro de calibração (RMSEC), do erro de validação cruzada (RMSECV), do erro de previsão (RMSEP), do coeficiente de determinação de previsão (R^2_P), e do rácio do intervalo de valores sobre o erro (RER).

Os valores de R^2_P variaram entre 0,91 e 0,97 e os valores de RER variaram entre 14,7 e 18,1 considerando apenas as amostras moídas e os vários parâmetros modelados. Para as amostras inteiras, os valores de R^2_P variaram entre 0,89 e 0,93 e os valores de RER variaram entre 10,1 e 14,3. Os modelos responderam adequadamente a todos os parâmetros estudados, tanto nas amostras moídas como nas inteiras (valores de RER acima de 10 para todos os parâmetros). No entanto, as amostras moídas apresentaram melhores resultados pois obtiveram valores de R^2_P mais próximos de 1 e valores superiores de RER. Em ambos os casos, foi demonstrado que a espectroscopia NIR tem a capacidade de estimar os parâmetros estudados de forma eficaz (rápida e com baixo custo), sem que seja necessário nenhum pré-processamento das amostras, sendo portanto este método adequado para uma avaliação rápida deste tipo de amostras em aplicações industriais.

Palavras-chave: Resíduos vitivinícolas, Espectroscopia de infravermelho próximo, Quimiometria, Compostos antioxidantes

ABSTRACT

The wine industry is known to generate large amounts of residues and their disposal is a problem because they are eco-toxic and there aren't many profitable applications. However, wine residues are rich in antioxidant compounds and their extraction and recovery presents as a good alternative. Therefore, it is important to develop a fast, simple and low cost technique for the evaluation of antioxidant compounds present in this residue. Near infrared spectroscopy (NIR) has all these features. It allows the analysis of multiple parameters simultaneously and can be applied *in situ* in a non-destructively manner.

This work aims at evaluating the total antioxidant capacity (TAC), total phenolic compounds (CFT) and the composition of wine industry residues (amount of grape seeds and skins) in raw and milled samples using NIR spectroscopy.

Models based on NIR spectra were developed with the aid of chemometric tools, namely partial least squares (PLS). Models' performance was evaluated resorting to the calibration error (RMSEC), cross-validation error (RMSECV), prediction error (RMSEP), coefficient of determination of prediction (R^2_P), and the range error ratio (RER).

Considering only milled samples, R^2_P and RER values ranged from 0.91 to 0.97 and from 14.78 to 18.1, respectively, for all modelled parameters. For raw samples, R^2_P and RER values ranged from 0.89 to 0.93 and from 10.1 to 14.3, respectively. All developed models performed adequately in milled and raw samples (RER values above 10 for all parameters). Milled samples showed better results with R^2_P values closer to 1 and higher values of RER. In both cases, it was demonstrated that NIR spectroscopy has the ability to estimate efficiently all the studied parameters (in a fast and low cost manner), without the need of any sample processing. It was demonstrated that this spectroscopic method is suitable for a quick assessment of this type of samples with special importance in industrial applications.

Keywords: Viticulture residues, Near infrared spectroscopy, Chemometrics, Antioxidant compounds

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, onde usufruí da oportunidade de realizar o mestrado em Controlo de Qualidade.

Ao Doutor João Lopes, pela orientação deste trabalho e pela hipótese que me concedeu para investigar esta temática.

Ao Doutor Ricardo Páscoa, pelo acompanhamento que dedicou ao longo da realização deste trabalho, e por toda a ajuda e esclarecimentos que facultou.

Ao grupo da Unidade de Quimiometria e Tecnologia Analítica de Processos do Laboratório de Química Aplicada pela simpatia e pelo ótimo ambiente de trabalho que proporcionaram durante a realização deste trabalho.

À minha família, em especial à minha mãe, que me apoiou sempre e motivou, particularmente nos momentos mais difíceis.

A todos os meus amigos pelas palavras encorajadoras para a concretização deste mestrado.

GLOSSÁRIO

- AAPH - 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) dihidroclorato
- ABTS - Radical 2,2'- azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)
- ADN - Ácido desoxirribonucleico
- CAT - Capacidade antioxidante total
- CCD - *Charge-coupled device*
- CFT - Compostos fenólicos totais
- CP - Componentes principais
- DPPH - Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
- FC - Capacidade redutora do Folin-Ciocalteu
- FIR - Infravermelho distante
- FRAP - Poder antioxidante de redução férrica
- GC - Cromatografia gasosa
- H₂O₂ - Peróxido de hidrogénio
- HO• - Hidroxilo
- HOCl - Ácido hipocloroso
- HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência
- ICS - Sociedade Internacional de Quimiometria
- KMBA - Substrato α -cetoácido- γ -metilbutírico
- L - *Loadings*
- LDL - Lipoproteína de baixa densidade
- LV - Variáveis latentes
- MIR - Infravermelho médio
- MSC - Correção multiplicativa de sinal
- NIR - Infravermelho próximo
- NO• - Óxido nítrico
- ¹O₂ - Óxigénio singleto
- O₂•⁻ - Superóxido
- ONOO⁻ - Peroxinitrito

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

ORAC - Capacidade de absorção de radicais de oxigénio

OSC - Correção ortogonal de sinal

PCA - Análise de componentes principais

PCR - Regressão por componentes principais

PDA - *Photodiode array*

PLS - Mínimos quadrados parciais

R - Resíduos

R^2_p - Coeficiente de determinação de previsão

RER - Rácio do intervalo de valores sobre o erro

RMSEC - Raiz quadrada do erro quadrático médio de calibração

RMSECV - Raiz quadrada do erro quadrático médio de validação cruzada

RMSEP - Raiz quadrada do erro quadrático médio de previsão

ROO• - Peroxilo

RO• - Alcoxilo

S - *Scores*

SNV - Variação de padrão normal

TAH - Transferência de átomos de hidrogénio

TE - Transferência de eletrões

TOSC - Capacidade antioxidante total

TRAP - Potencial reativo antioxidante total

UV-VIS - Ultravioleta-visível

ÍNDICE

Resumo	iii
Abstract.....	iv
Agradecimentos	v
Glossário	vi
Índice	viii
Objetivos	1
1 Introdução	2
1.1 Subprodutos da viticultura e suas possíveis aplicações	2
1.1.1 Vinho e o processo de vinificação	2
1.1.1.1 Viticultura.....	2
1.1.1.2 Processo de vinificação.....	3
1.1.1.3 Composição dos vinhos	6
1.1.2 Resíduos da indústria vitivinícola.....	8
1.1.2.1 Recuperação dos resíduos vitivinícolas.....	10
1.1.3 Antioxidantes	11
1.1.3.1 Tipos de compostos antioxidantes	13
1.1.3.1.1 Compostos antioxidantes endógenos	13
1.1.3.1.2 Compostos antioxidantes exógenos.....	13
1.1.4 Aplicações.....	20
1.2 Identificação, caracterização e quantificação de polifenóis.....	23
1.2.1 Métodos por via húmida	23
1.2.1.1 Métodos baseados no mecanismo de TAH.....	24
1.2.1.1.1 ORAC (<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>).....	24
1.2.1.1.2 TRAP (<i>Total Radical-trapping Antioxidant Parameter</i>)	24
1.2.1.1.3 TOSC (<i>Total Oxidant Scavenging Capacity</i>)	25
1.2.1.1.4 LDL Oxidation (<i>Low Density Lipoprotein Oxidation</i>).....	25
1.2.1.2 Métodos baseados no mecanismo de TE.....	27
1.2.1.2.1 FRAP (<i>Ferric reducing antioxidant power</i>)	27
1.2.1.2.2 FC (<i>Folin-Ciocalteu reducing capacity</i>).....	27
1.2.1.3 Métodos baseados no mecanismo de TE e TAH	29
1.2.1.3.1 ABTS (<i>2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)</i>)....	29
1.2.1.3.2 DPPH (<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical</i>).....	30

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

1.2.2	Métodos instrumentais	31
1.2.2.1	Espectrofotometria de ultravioleta-visível	31
1.2.2.2	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	33
1.2.2.3	Cromatografia gasosa	35
1.3	Espectroscopia de infravermelho próximo	37
1.4	Quimiometria	42
1.4.1	Pré-processamento dos espectros NIR	43
1.4.1.1	Método de Savitzky-Golay	43
1.4.1.2	Correção multiplicativa de sinal (<i>multiplicative scatter correction</i>)	46
1.4.1.3	Varição de padrão normal (<i>standard normal variate</i>).....	47
1.4.1.4	Correção ortogonal de sinal (<i>orthogonal signal correction</i>)	48
1.4.2	Análise multivariada	49
1.4.2.1	Análise de componentes principais (<i>principal component analysis</i>) ...	50
1.4.2.2	Mínimos quadrados parciais (<i>partial least squares</i>).....	51
1.4.2.3	Calibração	52
1.4.2.4	Validação	53
1.4.2.4.1	Validação cruzada	54
1.4.3	Processamento dos dados	55
1.4.3.1	Remoção da média (<i>mean centring</i>).....	55
1.4.3.2	Auto-normalização (<i>autoscale</i>)	55
2	Materiais e métodos.....	57
2.1	Reagentes e soluções	57
2.2	Resíduos de vinho.....	58
2.2.1	Compostos fenólicos totais dos extratos do bagaço	63
2.2.2	Capacidade antioxidante total dos extratos de bagaço	63
2.3	Aquisição espectral.....	65
2.4	Análise multivariada.....	66
3	Resultados e discussão	68
3.1	Compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante total do bagaço.....	68
3.2	Espectros NIR do bagaço	71
3.3	Modelo da composição do bagaço e da respetiva capacidade antioxidante.....	72
4	Conclusão.....	79
5	Perspetivas futuras	80
6	Bibliografia	81

OBJETIVOS

Esta Dissertação centrou-se no desenvolvimento de um procedimento para determinação rápida e a baixo custo da capacidade antioxidante de resíduos da indústria vitivinícola, nomeadamente do bagaço, pela técnica de espectroscopia de infravermelho próximo (NIR). A caracterização deste resíduo agro-alimentar envolveu as seguintes etapas principais:

- a determinação da quantidade de grainhas e películas, visto que cada um destes constituintes possui diferentes tipos de compostos antioxidantes e influencia de forma distinta as propriedades antioxidantes totais;

- a determinação dos compostos fenólicos totais (CFT) e da capacidade antioxidante total (CAT) para discriminar as amostras de bagaço com níveis mais altos de compostos antioxidantes (amostras com baixos níveis de compostos fenólicos e poucas propriedades antioxidantes não possuem interesse a nível da sua reutilização e podem ser imediatamente excluídas, evitando os demorados e dispendiosos procedimentos de extração);

- a avaliação da técnica NIR foi efetuada utilizando amostras de bagaço inteiras e moídas (n=96) considerando diferentes tempos de armazenamento (1 semana, 1 mês e 2 meses) de forma a avaliar a viabilidade da técnica NIR nas amostras com (moídas) e sem processamento (inteiras) e na definição do período de armazenamento mais adequado para a posterior extração dos compostos fenólicos.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Subprodutos da viticultura e suas possíveis aplicações

1.1.1 Vinho e o processo de vinificação

A produção de vinho é uma das atividades mais antigas que se conhece, tendo acompanhado a evolução social, cultural e económica de diversas civilizações. Evidências históricas, tais como resíduos de vinho encontrados em jarros de cerâmica, indicam que sua origem remonta possivelmente aos 6000 anos a.C. e continua a ter uma elevada importância em muitas culturas atualmente.¹

A uva é uma das frutas mais cultivadas a nível global, com uma colheita de cerca de 69 milhões de toneladas por ano, segundo a Organização Internacional da Vinha e do Vinho, dos quais 80% destinam-se à vinificação.²⁻⁶ Desde 2009, a produção de vinho em Portugal é em média cerca de 6,2 milhões de hectolitros de vinho por ano, o que o coloca entre os cinco maiores produtores de vinho da Europa,^{7, 8} facto confirmado pelo Observatório dos Mercados Agrícolas e das Importações Agroalimentares no ano de 2011. Esta indústria é um dos setores com elevado impacto a nível da exportação nacional de produtos agroalimentares.⁹

1.1.1.1 Viticultura

A viticultura é uma atividade agrícola ligada ao cultivo da videira para fins de produção de fruta fresca e/ou vinho. A videira é um arbusto que apresenta um ciclo vegetativo de várias décadas e um aumento de produção ao longo dos anos.¹⁰ Tal como outras plantas, utiliza a energia proveniente do sol para produzir açúcares e oxigénio a partir de dióxido de carbono e água durante o processo de fotossíntese. Alguns destes açúcares são usados nos processos metabólicos do sistema da planta, enquanto outros são armazenados nas raízes até ao período em que as uvas começam a amadurecer. Nesta fase os açúcares migram até à uva tornando-a mais doce à medida que amadurece. A qualidade da uva está intimamente ligada aos níveis de açúcares totais e como tal é muito importante determinar os teores dos mesmos (° Brix).¹⁰

Mais de 20 milhões de hectares de videiras são cultivadas em todo o mundo. Existem mais de 50 espécies de videiras diferentes, sendo a *Vitis vinífera* a espécie mais cultivada a nível mundial especificamente para a produção de vinho. Esta espécie é nativa da Europa onde predominam os climas temperados e possui centenas de variedades.

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Espécies como a *Vitis labrusca*, típicas dos Estados Unidos, são mais resistentes a doenças e suportam climas mais frios do que a *Vitis vinífera*.¹⁰

A seleção de um local com o clima adequado para cultivo da videira é extremamente importante visto que fatores como o frio e calor excessivo, humidade, chuvas frequentes e geadas, durante o período de crescimento, estão associados a diversos problemas no desenvolvimento apropriado das videiras.¹⁰ As características climáticas desejáveis incluem uma boa exposição ao sol, temperaturas de inverno amenas e ausência de geadas. É igualmente importante a presença de grandes massas de água próximo do local de cultivo pois ajuda a moderar mudanças drásticas de temperatura. No entanto, o clima mais apropriado depende da variedade de videira.¹⁰

As videiras possuem a capacidade de se adaptarem a uma vasta gama de tipos de solo, embora apresentem uma produtividade superior quando os seus sistemas radiculares são bem desenvolvidos e saudáveis. As condições de solo que permitem um desenvolvimento adequado da videira são arejamento e boa drenagem do solo, textura solta da terra e fertilidade moderada.¹⁰

A articulação entre os fatores climáticos, as características do solo, a espécie de videira e o equilíbrio da própria planta está intrinsecamente ligada à qualidade da uva e consequentemente à qualidade do vinho.¹⁰

1.1.1.2 Processo de vinificação

A produção do vinho ou a vinificação é o processo pelo qual a uva é transformada em vinho e é constituída por diversas etapas, nomeadamente, vindima, separação do engaço, esmagamento, maceração, fermentação, filtração e maturação.

O primeiro passo da vinificação, a vindima, é a colheita das uvas. É conveniente que as folhas se mantenham o mais verde possível até ao período da vindima e que as uvas tenham atingido a sua maturação.

Após a colheita dos cachos de uva, o engaço, constituído pela ramificação do bago, é separado e rejeitado.

Posteriormente, segue-se o esmagamento que tem como objetivo romper a película da uva de modo a libertar todos os compostos presentes nesta e a iniciar o processo de fermentação.

Segue-se a maceração, que é a operação onde ocorre a imersão e o contacto do sumo das uvas, também denominado de mosto (nesta fase), com a sua parte sólida, nomeadamente as películas e grainhas. Esta etapa promove a extração de compostos da película, polpa e grainha e a sua transferência para o mosto, que contribui em grande escala para a cor, sabor e aroma do vinho.^{11, 12} Hoje em dia existem outros tipos de

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

maceração tal como a fermentação carbónica, que consiste na colocação de uvas inteiras num depósito com uma atmosfera saturada em CO₂. Este procedimento aumenta a permeabilidade da parede celular das células da película e promove uma extração mais eficaz de compostos fenólicos entre outros.¹³

A fermentação é passo seguinte onde os açúcares da uva (principalmente a glicose e a frutose) são transformados em álcool etílico e dióxido de carbono, segundo a equação 1:¹⁰

$C_6H_{12}O_6$ (açúcares da uva) \rightarrow $2C_2H_5OH$ (etanol) + $2CO_2$ (dióxido de carbono) + 56kcal de energia calorífica

Nos vinhos tintos, a maceração e a fermentação alcoólica ocorrem simultaneamente. Neste caso pode ser necessário efetuar remontagens para homogeneizar a solução e maximizar a extração, visto que devido à formação de gás proveniente da fermentação o bagaço tem tendência a concentrar-se na parte superior da cuba diminuindo o contacto entre este e o mosto. A remontagem consiste na submersão do bagaço no mosto ou na remoção do mosto pela parte inferior da cuba e a sua reinserção na parte superior da mesma.¹²

Nos vinhos brancos a maceração é inevitável, no entanto o sumo das uvas é imediatamente separado das películas e grainhas das uvas, e fermenta sozinho.¹³

Para que o processo de fermentação ocorra é necessário a presença de leveduras, uma vez que atuam como catalisadores da reação.¹⁰ Estas encontram-se normalmente presentes nas uvas, no entanto pode ser necessária a sua adição pelos enólogos.^{10, 14} Uma das espécies de levedura mais utilizadas na produção de vinho é a *Saccharomyces cerevisiae*.¹⁵ Além da presença de leveduras para que o processo de fermentação se inicie, é importante dar especial atenção à temperatura uma vez que esta influencia o desenvolvimento das leveduras. Quanto mais elevada a temperatura, maior a rapidez do processo fermentativo, no entanto, temperaturas demasiado altas podem destruir as leveduras.¹⁵

Durante o processo de fermentação, ocorre a fermentação alcoólica e a fermentação malolática. A fermentação alcoólica é responsável pela transformação do açúcar em álcool e acaba quando todo o açúcar é transformado. ¹⁶A fermentação malolática ocorre após a fermentação alcoólica num processo em que as bactérias lácticas existentes no sumo das uvas transformam o ácido málico aqui presente em ácido láctico, diminuindo a acidez do vinho e consequentemente tornando-o mais suave a nível organolético.¹⁷

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Após a fermentação, o sumo das uvas é filtrado através de membranas com determinada porosidade de modo a remover as impurezas sólidas que possui. Este processo deve ser efetuado suavemente de modo a não extrair os taninos mais amargos presentes nas películas e grainhas. Os fatores que mais influenciam a eficácia da filtração são a pressão e a velocidade do fluxo da filtração. Se a pressão for demasiado alta provoca taxas de fluxo baixas o que leva a uma remoção excessiva de cor e sabor. A filtração ideal do vinho é caracterizada por baixa pressão, e taxas de fluxo constantes e moderadas. Antes deste processo é importante saber qual o grau de clareza do vinho que se pretende assim como a determinação da quantidade de cor e sabor perdido, pois esta operação de filtragem remove inevitavelmente cor e sabor ao vinho. Isto faz com que muitos vinhos que não são filtrados sejam considerados de maior qualidade.¹⁰ A microfiltração é um dos tipos de filtração mais utilizada na indústria do vinho e ocorre através de uma membrana semi-permeável que separa partículas com dimensão inferior a 5µm do vinho. Estes limites são bastante inferiores aos limites de filtração "estéreis", e apenas exige uma pressão muito baixa, normalmente de 5 a 15 psi. A ultrafiltração, outro tipo de filtração, utiliza membranas menos porosas e uma gama de pressão mais elevada, de 10 a 150 psi, com o objetivo de separar moléculas de elevado peso molecular da solução.¹⁰ A melhoria contínua deste tipo de filtros reduziu o tempo de limpeza e promoveu uma redução considerável no custo do vinho.¹⁰

Após a filtração, o vinho é incubado durante um determinado período de tempo de modo a amadurecer calmamente e desenvolver todas as suas qualidades. Este processo denomina-se maturação ou envelhecimento do vinho. A incubação do vinho pode ser efetuada numa pipa de madeira de dimensões variáveis ou através de outros recipientes específicos desenvolvidos recentemente com a evolução das técnicas vitivinícolas. A utilização da pipa de madeira deve-se ao facto de esta promover uma influência na composição química do vinho e ajudar a fortalecer a sua qualidade no que diz respeito ao aroma, sabor e cor. Isto ocorre devido a diversas reações, nomeadamente, a extração de componentes da madeira e a sua transferência direta para o vinho, a decomposição de macromoléculas da madeira e reações entre os compostos da madeira e os compostos do vinho.¹⁸ Até hoje já foram identificados mais de 200 componentes voláteis na madeira de carvalho. Os enólogos podem encontrar uma vasta literatura sobre estes componentes e o seu respetivo efeito no sabor dos vinhos.¹⁰

Desta forma, o recipiente selecionado para incubar o vinho depende das características que pretendemos englobar no sabor deste. Quando são utilizados recipientes à base de materiais diferentes da madeira, é possível adicionar fragmentos de madeira de carvalho para que o desenvolvimento das características seja semelhante ao do

envelhecimento na pipa de madeira.¹⁹ Neste processo, devem ser efetuados testes regularmente para avaliar a qualidade do vinho, visto que nesta etapa é possível adaptar as condições de modo a que os resultados possam ir ao encontro dos objetivos pretendidos.

O tempo que o vinho permanece na pipa durante a fase de maturação depende da estrutura deste vinho. Se o vinho for rico em polifenóis, a fase de maturação pode variar entre os 12 a 18 meses. Se o vinho for pouco estruturado varia entre os 6 a 8 meses. Mas é o enólogo e as suas avaliações que permitem realmente definir o pico máximo de maturação de um vinho.

1.1.1.3 Composição dos vinhos

Existem diversos estudos recentes que associam o consumo moderado de vinho com efeitos benéficos para a saúde.^{20, 21} Os principais compostos responsáveis por este efeito são os compostos antioxidantes (vão ser discutidos numa secção posterior), nomeadamente os compostos fenólicos, também denominados de polifenóis.²⁰ Estes compostos desempenham também um papel muito importante na qualidade final do vinho pois têm uma elevada influência nas características organolépticas, principalmente a nível da cor, adstringência e amargor.^{8, 22}

O conjunto de polifenóis do vinho não depende unicamente da presença destes nas uvas pois a composição de ambos é quimicamente distinta.⁷ Segundo vários estudos, os compostos antioxidantes dos diversos tipos de uva dependem de fatores como o clima, os níveis de CO₂ e a região.²⁰ Os compostos antioxidantes presentes nos vinhos são influenciados pelo tipo de uva utilizada, as práticas vitivinícolas, as diferentes técnicas enológicas, o ano de colheita, o processo de vinificação, entre outros.^{8, 23} De todas as variáveis que influenciam a presença dos polifenóis nos vinhos, o processo de vinificação é o que tem mais influência.

Durante a maceração e fermentação ocorre a transferência de polifenóis da uva para o vinho, assim como a formação de novos polifenóis devido ao contacto entre as películas, grainhas e o sumo das uvas (figura 1).²² Neste processo, as uvas são submetidas a uma prolongada extração fornecendo ao vinho tinto um teor variável de polifenóis.⁵ O contacto com a película que é rica em antocianidinas proporciona ao vinho tinto a expressão da sua cor final.^{24, 25}

Os microrganismos envolvidos no processo fermentativo, também desempenham um papel importante na composição final do vinho, pois possuem a capacidade de provocar oxidação ou a hidrólise dos componentes e assim provocar a alteração dos compostos antioxidantes presentes inicialmente nas uvas.²²

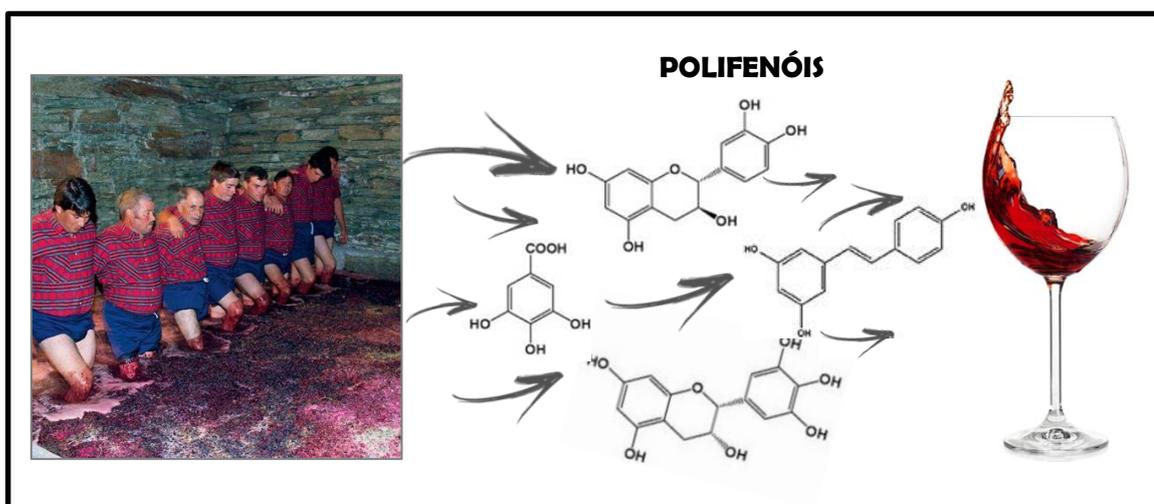


Figura 1 -Maceração (adaptado de ²⁶ e ²⁷)

Os vinhos brancos não possuem tantos polifenóis quando comparados com os vinhos tintos, visto que não existe contacto entre as películas, grainhas e o sumo de uva durante a fermentação como referido anteriormente.⁷ Este facto diminui as qualidades benéficas do vinho branco para a saúde, considerando também o seu alto conteúdo alcoólico.⁷

Além das reações entre o vinho e a pipa de madeira, a maturação é uma etapa onde continuam a ocorrer reações químicas entre os compostos do vinho, que conferem consideráveis alterações na sua composição, nomeadamente a nível do tipo e quantidade de polifenóis.⁷ Estas alterações vão desde a diminuição da atividade antioxidante devido à polimerização dos polifenóis, ao aumento da atividade antioxidante devido ao processo de aquecimento do vinho.²²

1.1.2 Resíduos da indústria vitivinícola

No decorrer do processo de vinificação, são produzidas grandes quantidades de resíduos, nomeadamente o bagaço e o engaço. O bagaço da uva é composto principalmente pelas películas e grainhas das uvas (figura 2a) enquanto o engaço é formado pelas hastes, nomeadamente a ramificação que suporta o bago (figura 2b).²⁸



Figura 2- a) bagaço e b) engaço (adaptado de ²⁹ e ³⁰, respetivamente)

Os resíduos vitivinícolas representam 20% a 25% do peso total da uva utilizado neste processo, correspondendo a 9 milhões de toneladas de resíduos por ano mundialmente (figura 3).^{3, 4, 28, 31} Como tal, o seu armazenamento, transformação e eliminação, apresentam problemas tanto em termos ecológicos como económicos.^{24, 32, 33}



Figura 3 - Resíduos da indústria vitivinícola (adaptado de ³⁴)

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Visto que o bagaço é um resíduo proveniente do processo de vinificação, é reconhecido por possuir igualmente um grande teor de polifenóis,^{5, 22} que podem ser identificados como flavonóides e não flavonóides. Os não flavonóides incluem compostos como os ácidos fenólicos, os ácidos hidroxicinâmicos, os estilbenos (tal como o resveratrol) e fenóis simples. Os flavonóides incluem compostos como os flavonóis (tal como a quercetina e o campferol), as antocianinas (tal como a malvidina), os flavanóis (tal como a catequina e epicatequina), e os seus produtos de condensação poliméricos, nomeadamente as proantocianidinas ou taninos condensados.^{3, 28, 35, 36} As antocianinas são consideradas os compostos antioxidantes mais valiosos nos resíduos da vinificação das uvas tintas e são responsáveis pela sua cor.²⁵ Quando comparados com os resíduos de uvas brancas, apresentam uma abundância vinte vezes superior.³ Além dos compostos antioxidantes mencionados anteriormente, o bagaço é igualmente composto por quantidades significativas de lípidos, proteínas, fibras dietéticas e minerais não digeríveis.²⁸ O elevado teor de fibra dietética, nomeadamente glicanos, celulose e pectinas, aumentam o valor nutritivo deste resíduo com vista à sua utilização numa ampla gama de aplicações como ingredientes alimentares.^{37, 38}

Os compostos antioxidantes presentes nas grainhas e películas da uva são diferentes (figura 4). Os principais compostos fenólicos das grainhas são os ácidos fenólicos (nomeadamente o ácido gálico), os flavonóis, as proantocianidinas, e o resveratrol.²⁸ Nas películas os principais compostos são os ácidos hidroxicinâmicos, os flavonóis (principalmente a quercetina), as antocianidinas e o resveratrol.^{23, 28, 39} As catequinas e as proantocianidinas das películas e grainhas são os principais compostos responsáveis pela adstringência e amargura do vinho.^{22, 23} As grainhas apresentam na sua composição 13 a 19% de óleo, rico em ácidos gordos essenciais, cerca de 11% de proteínas e 60 a 70% de hidratos de carbono não-digeríveis e antioxidantes.²⁸ A composição das películas compreende aproximadamente 6% de proteínas, 4% de ácidos gordos, 13% de celulose, 4% de resíduo mineral, 54% de água, 9% de sacarose e 2% de flavonóides.³⁹



Figura 4 - Películas e grainhas de uva (adaptado de ⁴⁰ e ⁴¹, respetivamente)

1.1.2.1 Recuperação dos resíduos vitivinícolas

Atualmente as aplicações industriais existentes para o processamento dos resíduos vitivinícolas têm como objetivo a extração de ácido tartárico e a produção de etanol.⁴² Geralmente o resíduo sólido final é utilizado como fertilizante.⁴³ Tem sido também utilizado como aditivo na alimentação animal, no entanto, a presença de polímeros tal como a lignina, reduz a digestibilidade pois inibe enzimas celulolíticas, proteolíticas e o crescimento de bactérias no estômago dos seres ruminantes, cuja presença constitui parte integrante do seu processo de digestão.²⁶

Como se pode verificar, os resíduos vitivinícolas apresentam um elevado teor de compostos bioativos⁷ e essa característica despertou o interesse para a sua extração e reutilização.^{5, 44} Desta forma, prevê-se que estes resíduos possam ser uma futura fonte rentável de compostos antioxidantes naturais.³² Além das características antioxidantes benéficas para a saúde, estes compostos podem constituir um papel importante no campo da enologia pelo facto de serem responsáveis por características organolépticas, tais como a cor, o sabor e o aroma, como referido anteriormente.⁴⁵

Como tal, as técnicas de extração destes compostos têm sido intensamente estudadas,^{5, 31, 36, 44, 46-48} uma vez que esta etapa é imprescindível para posteriores potenciais aplicações. Neste sentido, a melhoria das técnicas de extração podem permitir a obtenção de elevadas quantidades de compostos bioativos, a diminuição do tempo de extração assim como uma baixa utilização de solventes orgânicos, de modo a aumentar a sustentabilidade e a segurança alimentar deste processo.⁵

Diversos solventes são usualmente utilizados na extração de compostos, tais como o etanol, metanol, propanol, éter etílico e acetato de etilo.^{46, 49} A eficácia de um solvente depende de fatores, tais como, a matriz do material em que se pretende efetuar a extração e a polaridade do próprio solvente.⁴⁹ Quanto maior a polaridade do solvente, melhor é a solubilidade dos compostos fenólicos.⁵⁰ A extração é mais eficaz quando são utilizados solventes à base de álcoois polares.⁴⁹ Como tal, o etanol é dos solventes mais utilizados pois além de promover uma extração eficiente, é especialmente adequado quando esta tem como fim a utilização dos compostos na indústria alimentar.⁵¹ A adição de água a este solvente melhora a sua taxa de extração.^{49, 51} A utilização de acetato de etilo é também adequada à posterior aplicação dos extratos a nível alimentar.⁴⁶ Devido à sua baixa polaridade, este solvente extrai principalmente os polifenóis que são facilmente dissolvidos na fração lipídica dos alimentos.⁴⁶ Além disso, o ponto de ebulição baixo facilita a sua remoção e reutilização.⁴⁶

1.1.3 Antioxidantes

Os antioxidantes podem ser definidos como um grupo de compostos que previnem e retardam as reações de oxidação embora não consigam reverter esse mesmo processo.⁵²⁻⁵⁴ Como tal, os compostos antioxidantes têm a capacidade de neutralizar os radicais livres provenientes das reações de oxidação pois conseguem ceder-lhes eletrões sem se tornarem eles próprios radicais livres.⁵⁵ Os radicais livres são moléculas cuja estrutura química apresenta um ou mais eletrões de valência desemparelhados, devido à ação de uma cisão homolítica que quebra as ligações covalentes e que torna estas espécies altamente reativas.^{55, 56} De modo a promover a sua estabilidade, estas espécies tendem a captar um eletrão de uma molécula estável provocando a sua oxidação. Por sua vez, as espécies oxidadas reagem inevitavelmente com outras moléculas estáveis e assim consecutivamente, provocando uma reação em cadeia.⁵⁷ Se os radicais livres não forem inativados podem estar na origem da inibição de enzimas metabolicamente importantes e desencadear danos colaterais em biomoléculas como proteínas, hidratos de carbono, lípidos e ácidos nucleicos, comprometendo, deste modo, as funções vitais no organismo.⁵⁸⁻⁶² Um exemplo é o dano na cadeia de ADN, que induz uma proliferação de células mutantes por clonagem da célula danificada e consecutivamente o aparecimento de diversos tipos de cancro.^{47, 58} Outro exemplo acontece com as moléculas de colesterol LDL, que após a sua oxidação por radicais livres são mais facilmente absorvidas por macrófagos convertendo-se em "células de espuma", típicas da aterosclerose.^{58, 59}

Com a evolução da Terra houve inevitavelmente um aumento gradual da concentração de oxigénio atmosférico até aos atuais 21%. Visto que o metabolismo dos seres aeróbios não estava adaptado a níveis elevados de oxigénio nas células (hiperóxia) estes foram sofrendo cada vez mais a sua agressão.^{38, 128} Nos casos de hiperóxia, o O₂ torna-se tóxico para o ser humano devido à produção de uma elevada quantidade de espécies reativas de oxigénio.⁶¹ Estas espécies são os principais radicais livres presentes no corpo humano e envolvidos nas reações de oxidação.^{60, 63, 64} As espécies reativas de oxigénio englobam os radicais anião superóxido (O₂^{•-}), o peróxilo (ROO[•]), o alcóxilo (RO[•]), o hidroxilo (HO[•]), o óxido nítrico (NO[•]), o peroxinitrito (ONOO⁻) assim como derivados não radicais tais como o peróxido de hidrogénio (H₂O₂), o oxigénio singleto (¹O₂) e o ácido hipocloroso (HOCl).^{53, 64} O radical superóxido e o peróxido de hidrogénio são considerados as espécies menos reativas e o radical hidroxilo é considerado a espécie mais reativa.^{64, 65}

A presença de radicais livres no organismo pode ser induzida por mecanismos naturais ligados ao metabolismo celular do indivíduo ou através de fatores externos a que

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

o indivíduo se predispõe.^{62, 66} Os mecanismos internos que estão na origem da produção de radicais livres no organismo ocorrem como parte integral da homeostasia de processos celulares e englobam a mitocôndria, os peroxissomas, a xantina oxidase, a fagocitose, produtos da cascata do ácido araquidônico e de processos inflamatórios e a isquemia.^{58, 62, 67} Os fatores externos incluem o exercício físico, a poluição, radiações ionizantes, o ozono, solventes orgânicos, pesticidas, drogas, dietas ricas em ácidos gordos polinsaturados e fumo do tabaco.^{62, 64, 68} Além das consequências no corpo humano, os radicais livres estão também implicados na deterioração oxidativa de produtos alimentares.⁶³

Alguns dos mecanismos internos mencionados mostram que os radicais livres também possuem ações benéficas e essenciais em diversas reações fisiológicas do organismo,^{58, 66} tal como uma participação ativa no mecanismo de defesa do corpo humano.⁵⁸

Deste modo, a ação prejudicial dos radicais livres resulta unicamente do desequilíbrio entre a razão da quantidade de compostos oxidantes e antioxidantes.⁵³ Quando existe um maior número de compostos oxidantes presentes nas células afirma-se que estas se encontram sob *stress* oxidativo.^{66, 67} Assim sendo, quando a quantidade de compostos antioxidantes não é suficiente para suprimir a ação destas espécies reativas as células sofrem os danos referidos anteriormente. Estes danos estão na origem de diversos efeitos adversos no corpo humano tal como o envelhecimento, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e ao aparecimento de diversos cancros como já mencionado.^{47, 62, 68} Os compostos antioxidantes são por isso essenciais para o organismo^{47, 60} e podem atuar através da inibição da formação de radicais livres, da interrupção da reação em cadeia, do sinergismo com outros compostos antioxidantes, da conversão de hidroperóxidos em compostos estáveis, da inibição de enzimas pro-oxidantes e da conversão de metais pro-oxidantes em produtos estáveis através de agentes quelantes de metais.⁶²

Apesar destes compostos já terem sido considerados anti-nutrientes, muitos estudos comprovaram que as suas propriedades antioxidantes podem ter efeitos benéficos na saúde humana, nomeadamente na prevenção e tratamento do cancro assim como nas doenças cardiovasculares e neurodegenerativas.^{47, 69} O aumento do interesse na utilização destes compostos, além das propriedades referidas anteriormente, advém da sua elevada abundância em alimentos vegetais, da sua segurança alimentar e da baixa toxicidade no organismo.⁴⁷

A capacidade antioxidante dos compostos presentes nos alimentos e os consequentes efeitos benéficos são difíceis de estimar devido à quantidade, diversidade e complexidade destes compostos e à interação entre eles.^{5, 7} Além disso, o processamento

industrial e doméstico de alimentos assim como as reações biológicas no organismo após o seu consumo, estão associados a transformações químicas que podem alterar a constituição dos compostos antioxidantes.⁷

1.1.3.1 Tipos de compostos antioxidantes

Os compostos antioxidantes podem ser agrupados em compostos antioxidantes endógenos e exógenos.

Durante a evolução humana, o desenvolvimento de diversos mecanismos endógenos preveniram a defesa do organismo contra o *stress* oxidativo e formação de radicais livres.⁶² Os compostos antioxidantes endógenos proporcionam um equilíbrio entre compostos antioxidantes e radicais livres, no entanto, não são suficientes e é imprescindível para o organismo ingerir compostos antioxidantes externos de modo a manter um nível baixo de radicais livres.^{62, 68}

1.1.3.1.1 Compostos antioxidantes endógenos

Os compostos antioxidantes endógenos são divididos em dois grandes grupos: antioxidantes enzimáticos e os antioxidantes não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos são normalmente subdivididos em primários e secundários consoante a defesa que proporcionam.⁶² Os compostos enzimáticos primários incluem a glutathione peroxidase, a catalase e o superóxido dismutase. E os secundários incluem a glutathione reductase e a glucose-6-fosfato desidrogenase.⁶² O benefício destes compostos para o organismo pode ser demonstrado pela enzima catalase, cuja ação de apenas uma molécula promove a conversão de 6 milhões de moléculas de peróxido de hidrogénio em moléculas de água e oxigénio.⁶²

Relativamente aos compostos antioxidantes não enzimáticos são identificadas diversas vitaminas, cofatores enzimáticos, compostos de azoto e péptidos.⁶²

1.1.3.1.2 Compostos antioxidantes exógenos

Os antioxidantes exógenos incluem diversos tipos de substâncias nomeadamente vitaminas antioxidantes (especificamente a vitamina C e a vitamina E), carotenóides, compostos fenólicos e alguns oligoelementos.^{64, 70, 71} Os compostos fenólicos ou polifenóis constituem um dos maiores grupos de compostos antioxidantes naturais presentes nas plantas e englobam uma vasta variedade de moléculas, desde moléculas simples a moléculas altamente polimerizadas.^{5, 28, 47, 69} Estes compostos são extremamente importantes no metabolismo das plantas pois estão envolvidos no crescimento,

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍCOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

reprodução e proteção contra a radiação ultravioleta, 47 agentes patogénicos, parasitas e predadores.⁶⁹ São considerados metabolitos secundários das plantas e podem ser sintetizados através de duas vias distintas, nomeadamente a via acetato ou a via do ácido chiquímico (figura 5).^{47, 69}

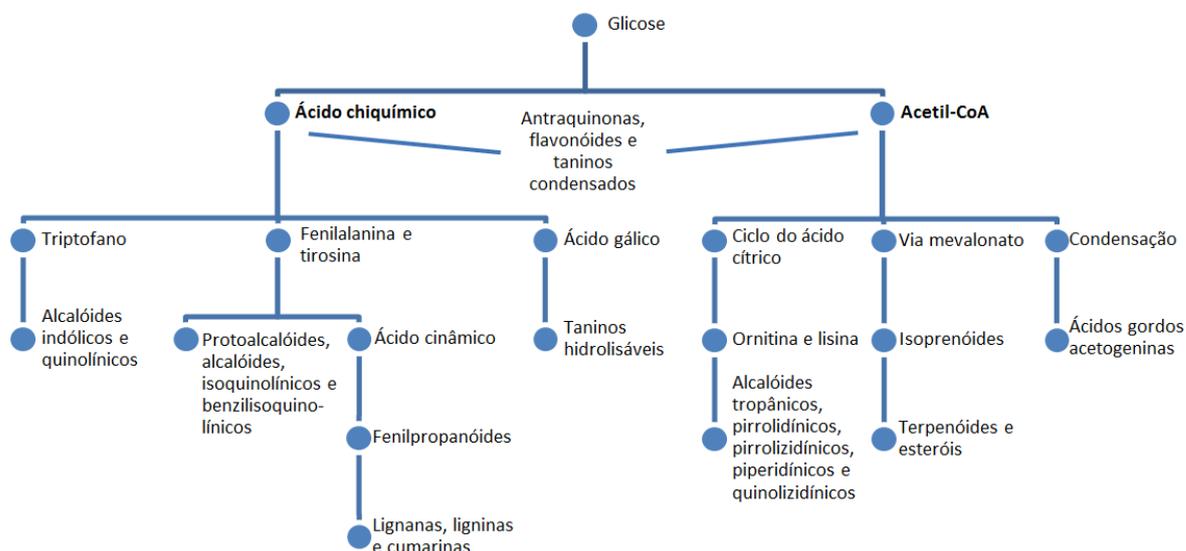
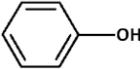
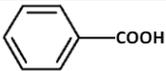
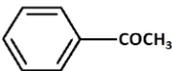
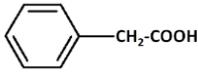
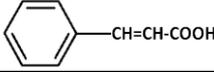
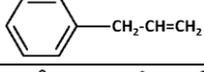
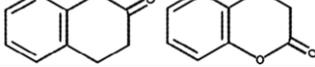
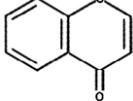
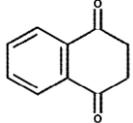
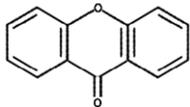
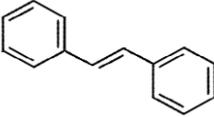
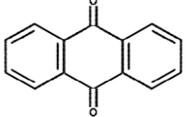
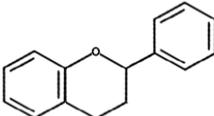
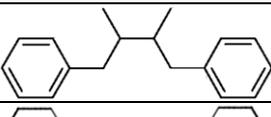
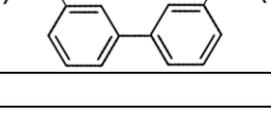


Figura 5 - Ciclo de produção dos metabolitos secundários (adaptado de ⁷²)

A estrutura básica destes compostos possui um ou mais grupos hidroxilos ligados a anéis aromáticos e podem estabelecer associações com outros compostos, tais como grupos carboxílicos, ácidos orgânicos, aminas e lípidos.^{5, 69} Atualmente são conhecidos cerca de 8000 polifenóis, subdivididos em 10 grandes classes, de acordo com a sua estrutura química e no qual os flavonóides são o grupo mais relevante (tabela 1).^{47, 69}

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Tabela 1 - Principais classes de polifenóis (adaptado de ⁶⁹)

Classe	Formula química básica	Estrutura básica
Fenóis simples	C_6	
Benzoquinonas	C_6	
Ácidos fenólicos	C_6-C_1	
Acetofenonas	C_6-C_2	
Ácidos fenilacéticos	C_6-C_2	
Ácidos hidroxicinâmicos	C_6-C_3	
Fenilpropenos	C_6-C_3	
Cumarinas, isocumarinas	C_6-C_3	
Cromonas	C_6-C_3	
Naftoquinonas	C_6-C_4	
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$	
Estilbenos	$C_6-C_2-C_6$	
Antraquinonas	$C_6-C_2-C_6$	
Flavonóides	$C_6-C_3-C_6$	
Lignanas	$(C_6-C_3)_2$	
Neolignanas	$(C_6-C_3)_2$	
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$	

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

A sua diferenciação resulta das suas estruturas químicas e são geralmente agrupados em subclasses. ^{5, 28}

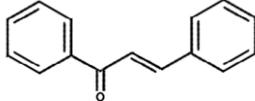
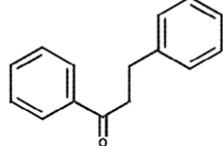
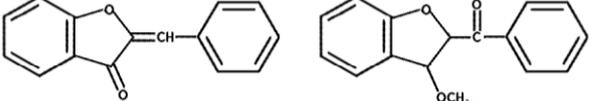
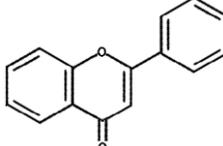
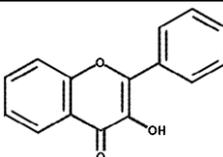
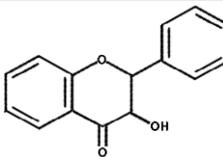
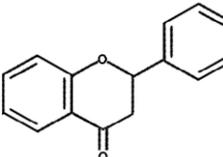
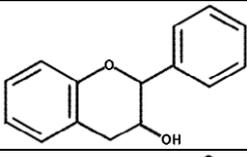
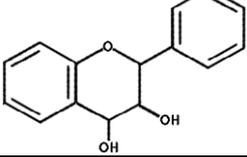
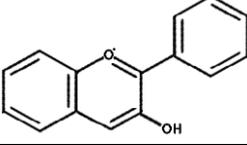
Os fenóis simples e os flavonóides representam a grande maioria de compostos presentes nas plantas e correspondem a compostos solúveis com capacidade de ligação aos componentes da parede celular.⁶⁹ Os fenóis simples pertencentes ao grupo com menor peso molecular encontram-se vastamente distribuídos em diversos tipos de plantas.⁶⁹

Os flavonóides são constituídos por 5000 compostos agrupados em 13 classes diferentes e são considerados os compostos polifenóis mais abundantes na nossa dieta.^{7, 28, 47} Existem nas plantas e também em sementes, nozes, grãos, especiarias e diferentes plantas medicinais, assim como em bebidas, como o vinho, chá e cerveja em níveis relativamente mais baixos.⁷³ Normalmente aparecem na forma de derivados de glicosídeo ou esporadicamente na forma de agliconas e contribuem para os tons de azul, púrpura, e laranja, em folhas, flores e frutos.^{64, 69}

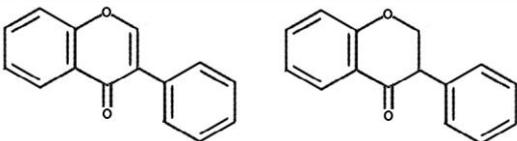
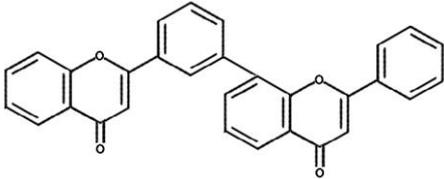
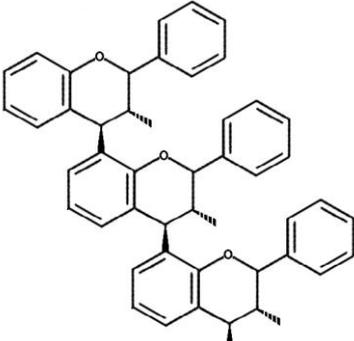
A estrutura mais comum dos flavonóides é a difenilpropano (C₆-C₃-C₆) e baseia-se na ligação de dois anéis aromáticos através de três carbonos que usualmente formam um anel heterocíclico oxigenado.^{69, 74} Os flavonóides incluem antioxidantes como as antocianinas, flavonóis, flavanóis, flavonas, flavanonas e flavonóides simples ou polimerizados, como se pode observar na tabela 2.^{23, 64}

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Tabela 2 - Classificação dos flavonóides (adaptado de ⁶⁹)

Classes dos Flavonoides	Estrutura básica
Chalconas	
Dihidrochalconas	
Auronas	
Flavonas	
Flavonóis	
Dihidroflavonóis	
Flavanonas	
Flavanóis	
Flavandiol ou leucoantocianidinas	
Antocianidinas	

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Isoflavonóides	
Biflavonóides	
Proantocianidinas ou taninos condensados	

As flavonas, os flavonóis e os seus glicosídeos são os flavonóides mais comuns presentes na natureza em todas as espécies de plantas à exceção das algas e fungos.⁶⁹ Na classe dos flavonóis pode encontrar-se a quercetina, o campferol e a miricetina, que são predominantes em vegetais e frutas como a cebola, brócolos e maçã.^{47, 69} As flavonas tal como a apigenina, a luteolina e a crisina são maioritariamente encontradas em ervas aromáticas⁷⁵ e em grãos de cereais.⁶⁴ Os seus análogos hidrogenados, as flavanonas, nomeadamente a hesperetina e naringina encontram-se quase exclusivamente em frutas cítricas.^{47, 64, 75}

Os isoflavonóides estão presentes principalmente em leguminosas como a soja, feijão preto, feijão-verde e grão-de-bico. Alfafa, brotos e sementes de girassol também contêm este tipo de flavonóides.^{64, 75}

O grupo flavanol, também denominado de flavano-3-ol, inclui a catequina, a epicatequina e alguns ésteres de galato, tal como a epigalocatequina. Estas substâncias encontram-se amplamente distribuídas nas plantas e estão em grande quantidade nas folhas de chá.⁶⁴ Além disso, o grupo de flavanóis compreende também os seus produtos de condensação poliméricos, nomeadamente as proantocianidinas ou taninos condensados, que estão normalmente presentes em maçãs, uvas, frutas vermelhas, dióspiro, groselha preta, sorgo e grãos de cevada.^{64, 75} Os taninos são moléculas que se encontram frequentemente na forma condensada ou hidrolisada e possuem peso molecular médio a alto.^{47, 69} A unidade monomérica é um flavano-3-ol, com um flavano-3,4-diol ou uma molécula de leucoantocianidina como seu precursor.⁵¹ A grande variedade na estrutura

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

destas moléculas deve-se às diversas possibilidades de ligação oxidativa.⁴⁷ Podem formar complexos insolúveis com proteínas e hidratos de carbono, o que os torna responsável pela adstringência dos alimentos devido à sua ação de precipitação das proteínas salivares.⁴⁷

As antocianidinas e os seus glicosídeos (antocianinas) são dos compostos mais disseminados do reino das plantas.^{47, 76} São pigmentos vegetais solúveis em água, responsáveis pela cor das flores, frutas e plantas superiores.⁶⁹

Todos os alimentos que utilizam plantas na sua elaboração ou que derivam de sementes possuem flavonóides enquanto alimentos de origem animal não.⁷⁵ A preparação e o processamento das frutas e legumes podem diminuir o conteúdo de flavonóides em 50%.⁷⁵ Os flavonóides são conjugados no fígado ou nos rins e excretados na bÍlis ou urina. As bactérias presentes no cólon dividem o anel heterocíclico e degradam os flavonóides em ácidos fenólicos de modo a que possam ser absorvidos, excretados ou metabolizados por estas bactérias.⁷⁵

1.1.4 Aplicações

Atualmente os polifenóis são usados como matéria-prima para diversas aplicações industriais tais como a produção de tintas, papéis, cosméticos, bronzeadores e aditivos alimentares especificamente corantes e conservantes naturais.⁶⁹ Alguns compostos fenólicos, tal como os flavonóides, podem ser também extremamente úteis no desenvolvimento de anti-inflamatórios, antibióticos, agentes anti-diarreicos, e em medicamentos relacionados com o tratamento de doenças como a hipertensão, fragilidade vascular, alergias, hipercolesterolemia, entre outras.^{73, 77, 78}

Os resíduos provenientes do processamento de diversos produtos agro-alimentares, como os resíduos vitivinícolas, apresentam um impacto ambiental extremamente negativo, quando depositados no meio ambiente uma vez que contêm substâncias orgânicas com efeitos fitotóxicos que podem inibir a germinação de diversas plantas.^{36, 43, 46} O aumento da produção destes resíduos aumentou a necessidade da sua reciclagem, recuperação e reutilização.⁷⁹ Assim sendo, no sentido de promover uma maior sustentabilidade das indústrias agro-alimentares, e diminuir a poluição ambiental, uma das preocupações atuais é diminuir a quantidade destes resíduos e promover a procura de alternativas para a sua valorização.^{5, 36} Atualmente os compostos sintéticos utilizados em diversas indústrias são cada vez mais rejeitados pelos consumidores, que exigem a sua substituição por compostos naturais e seguros. A extração de compostos naturais de subprodutos industriais, apresenta-se como uma alternativa muito interessante capaz de promover um equilíbrio sustentável.^{3, 5, 36}

O estudo e utilização de compostos antioxidantes naturais tem suscitado um enorme interesse em diversas áreas, uma vez que são considerados extremamente seguros para a saúde humana, ao contrário dos antioxidantes sintéticos utilizados na indústria alimentar que possuem efeitos indesejáveis, tais como toxicidade e carcinogenicidade.^{24, 34} O aumento do interesse nestes compostos também tem sido influenciado por parte dos consumidores, pois começa a ser amplamente difundido uma relação direta entre a dieta realizada e o estado de saúde dos mesmos.⁸⁰ Deste modo, a produção de ingredientes e alimentos funcionais, suplementos nutricionais e a fortificação de alimentos com compostos antioxidantes naturais podem proporcionar uma maior ingestão destes compostos com diversos efeitos benéficos e são uma potencial alternativa para a utilização de resíduos e a minimização das suas quantidades.^{3, 41}

Assim, a exploração de resíduos ou subprodutos da indústria agro-alimentar como fonte de compostos antioxidantes naturais é um campo bastante promissor e com expectativas de aumento sustentado.³ Existem já bastantes referências a aplicações, em

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVINÍCOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

diversas áreas, de compostos antioxidantes provenientes de diferentes tipos de resíduo (tabela 3).

Tabela 3 - Aplicações dos polifenóis provenientes de diversos tipos de resíduos

Tipo de resíduo	Compostos extraídos	Exemplos de aplicações	Ref.
Borras de café	Ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido gálico e outros ácidos carboxílicos	- Produção de suplementos nutricionais (indústria nutracêutica) - Aditivos para cosmética - Aditivos para estabilização do aroma e conservação de produtos alimentares	81, 82
Bagaço de maçã	Ácido clorogénico, quercetina, catequina, epicatequina e floridizina	- Produção de alimentos funcionais	83
Extrato de casca de batata	Ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido gálico e ácido protocatecuico	- Aditivos para melhorar a estabilidade de produtos alimentares (retardar a oxidação lipídica e estender o prazo de validade)	84
Cascas de amendoins	Ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido coumárico, catequina, proantocianidina e resveratrol	- Fortificação de alimentos (incorporação em manteiga de amendoim) - Produção de ingredientes funcionais ou suplementos nutricionais - Aditivos para alimentação humana ou animal	85, 86
Bagaço de azeitonas	Tirosol, hidroxitirosol, ácido cafeico, verbascosídeo, secoiridoides e flavonóides tais como apigenina, luteolina e rutina	- Produção de energia - Adubos orgânicos - Aditivos para alimentação animal - Produção de suplementos nutricionais (indústria nutracêutica) - Aplicações terapêuticas (atividade antioxidante, antimicrobiana e anticancerígena)	87
Resíduos de romã	Antocianinas, ácido elágico, flavonóis e flavonas	- Aplicações terapêuticas - Aditivos para melhorar a palatabilidade e a estabilidade de produtos alimentares	29, 88
Bagaço de arando	Ácido elágico, ácido gálico, ácido clorogénico, ácido p-cumárico e ácido p-hidroxibenzóico	- Aplicação à indústria nutracêutica	89
Resíduos de casca de camarão	1,2 diamina-1(σ-hidroxifenil) propeno	- Aditivos para estabilização da cor	82

1.2 Identificação, caracterização e quantificação de polifenóis

A caracterização dos compostos antioxidantes é o primeiro passo para encontrar a melhor forma de valorizar e reaproveitar estes resíduos.²⁴ O acesso a estas propriedades permite estudar a composição dos resíduos assim como determinar os que possuem uma maior capacidade antioxidante.⁹⁰ Os métodos de análise para os compostos antioxidantes são definidos consoante o objetivo que se pretende determinar, uma vez que para diferentes classes de compostos existem métodos específicos para a sua identificação e/ou quantificação.⁴⁷ Isto deve-se à elevada quantidade destes compostos nas amostras e à diversidade de estruturas químicas. Como tal, é essencial que a caracterização das amostras seja efetuada através de métodos analíticos altamente específicos e sensíveis.⁵

1.2.1 Métodos por via húmida

Atualmente, o número de métodos e de variações nos métodos, para a determinação de compostos fenólicos e para a avaliação da capacidade antioxidante, aumentaram consideravelmente.⁹¹ Para o estudo completo das propriedades antioxidantes dos resíduos de vinho é imprescindível a utilização de diversos métodos uma vez que não existe um único método capaz de proceder à determinação de todos os compostos antioxidantes presentes nesta complexa matriz.^{92, 93} De seguida, enumeram-se as vantagens e desvantagens de alguns dos métodos mais utilizados.

Os métodos para a avaliação da capacidade antioxidante podem ser classificados em dois tipos, consoante o mecanismo de desativação dos radicais: ensaios baseados na transferência de átomos de hidrogénio (TAH) e ensaios baseados na transferência de eletrões (TE).^{90, 94}

Os ensaios TAH envolvem um sistema de reação competitiva, no qual o antioxidante e o substrato competem por radicais peróxido produzidos termicamente através da decomposição de compostos azo.^{63, 94} Estes radicais têm a capacidade de retirar um hidrogénio ao substrato iniciando-se a peroxidação lipídica. Quanto maior a concentração de compostos antioxidante na amostra maior será a inibição desta peroxidação. Estes ensaios incluem o ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), TRAP (*Total Radical-trapping Antioxidant Parameter*), TOSC (*Total Oxidant Scavenging Capacity*) e LDL Oxidation (*Low Density Lipoprotein Oxidation*).⁹⁴

Os ensaios TE medem a capacidade que um composto antioxidante possui para reduzir um oxidante, que muda de cor assim que é reduzido. O grau de mudança de cor está correlacionado com a concentração de antioxidantes na amostra. Os ensaios baseados

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

em TE incluem FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), FC (*Folin-Ciocalteu Reducing Capacity*), ABTS (*2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical cation*) e DPPH (*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical*).⁹⁴ Apesar dos ensaios de ABTS e de DPPH serem normalmente classificados na categoria TE, estes radicais podem ser neutralizados através de uma redução via TE assim como através do mecanismo da TAH.⁹⁵

1.2.1.1 Métodos baseados no mecanismo de TAH

1.2.1.1.1 ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

Neste ensaio, ocorre a formação de radicais peróxido que promovem a degradação oxidativa de uma molécula fluorescente, resultando na perda de fluorescência.^{63, 91} Os antioxidantes possuem a capacidade de proteger a molécula fluorescente e por isso a redução da fluorescência é inibida.^{63, 91}

Vantagens:^{94, 96, 97}

- é um método automatizado e
- pode ser adaptado à deteção tanto de antioxidantes hidrofílicos como hidrofóbicos, alterando a fonte de radicais e o solvente.

Desvantagens:^{91, 98, 99}

- é uma técnica extremamente sensível à temperatura;
- tempo de análise muito longo e
- os marcadores fluorescentes requerem a utilização de fluorímetros, que podem não estar disponíveis em alguns laboratórios.

1.2.1.1.2 TRAP (*Total Radical-trapping Antioxidant Parameter*)

A reação utilizada neste ensaio é semelhante à usada na técnica ORAC e foi introduzida para a determinação da capacidade antioxidante no plasma ou em soro humano.^{63, 100} Este método utiliza um sistema competitivo, no qual ocorre uma fase de latência (fase *lag*) induzida pela capacidade antioxidante do plasma para inibir a reação de peroxidação lipídica do substrato pelos radicais.⁶³ Deste modo a duração da fase *lag* é proporcional à capacidade antioxidante.⁹¹ Para aumentar a sensibilidade, a sonda reage com os radicais peróxido em baixas concentrações, dando origem a uma alteração espectroscópica acentuada entre a sonda nativa e oxidada.⁹¹

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Vantagens:⁹¹

- o método pode ser adaptado a qualquer sistema, processo fisiológico e a qualquer instrumentação prontamente disponível e
- é sensível a todos os antioxidantes presentes na amostra.

Desvantagens:⁹¹

- são usadas muitas variáveis dificultando a comparação dos resultados entre os laboratórios;
- a capacidade antioxidante que contribui após a fase *lag* é totalmente ignorada, o que pode subestimar o valor da medição e
- é uma técnica relativamente complexa, demorada e exige um elevado grau de conhecimento e experiência.

1.2.1.1.3 TOSC (*Total Oxidant Scavenging Capacity*)

Este método permite avaliar a capacidade antioxidante através de diferentes fontes de radicais, nomeadamente radicais hidroxilo, radicais peroxilo e peroxinitrito. O substrato α -cetoácido- γ -metilbutírico (KMBA) é oxidado pelos radicais livres e forma etileno. A formação do etileno é seguida através de uma análise por cromatografia gasosa (GC) e a capacidade antioxidante é tanto maior quanto maior a eficácia dos antioxidantes para inibirem a formação de etileno.⁹¹

Vantagens:¹⁰¹

- permite a quantificação da capacidade antioxidante de três oxidantes diferentes, nomeadamente, radicais hidroxilo, radicais peroxilo e peroxinitrito.

Desvantagens:⁹¹

- é difícil de adaptar a análises de alto rendimento visto que requer múltiplas injeções de uma única amostra no equipamento de GC para medir a produção de etileno e
- a comparação entre alimentos torna-se difícil devido aos múltiplos parâmetros envolvidos na cinética desta técnica.

1.2.1.1.4 LDL Oxidation (*Low Density Lipoprotein Oxidation*)

Nesta técnica, a lipoproteína de baixa densidade (LDL) é isolada a partir de amostras de sangue fresco e a sua oxidação é iniciada por um elemento de transição, tal como o Cu(II) ou por um composto azo hidrofílico AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropano)

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

dihidrocloro).^{102, 103} A leitura da oxidação é efetuada através da formação de dienos conjugados e determinado a 234 nm, após separação por HLPC. Após várias leituras o resultado é expresso através da duração da fase *lag*, que corresponde à ausência de dienos conjugados devido à capacidade antioxidante.⁶³

Vantagens:¹⁰²

- a utilização de AAPH é relevante visto que produz uma boa correlação entre a oxidação do LDL e o valor ORAC.

Desvantagens:⁹¹

- a utilização de Cu(II) não produz uma correlação eficaz entre a oxidação do LDL e o valor ORAC e
- a LDL tem de ser isolada segundo uma regra padrão e devido à necessidade de se obter amostras de sangue de indivíduos diferentes, não é possível obter preparações equivalentes, logo, é um método pouco consistente e pouco reprodutível.

1.2.1.2 Métodos baseados no mecanismo de TE

1.2.1.2.1 FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*)

O ensaio FRAP mede a capacidade dos antioxidantes reduzirem o complexo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina ao complexo ferroso de cor azul intenso em meio ácido.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ Os valores são calculados com base no aumento da absorvância a 593 nm.¹⁰⁷

Vantagens:^{91, 108}

- é uma técnica de alto rendimento e reprodutibilidade, especialmente utilizando um leitor de microplacas de 96 poços;
- é uma técnica simples, rápida, económica, robusta e não exige equipamento especializado e
- pode ser realizado utilizando métodos automatizados, semi-automáticos ou manuais.

Desvantagens:^{91, 99, 109-111}

- qualquer composto, mesmo sem propriedades antioxidantes, teoricamente pode reduzir o complexo férrico a complexo ferroso, contribuindo para o valor de FRAP e promovendo resultados falsos;
- nem todos os antioxidantes reduzem o complexo férrico a uma taxa suficientemente rápida para permitir a sua medição dentro do período de observação (normalmente 4 minutos) e
- esta técnica não deteta antioxidantes que atuam por transferência de átomos de hidrogénio, nomeadamente tióis tal como a glutathione e carotenóides.

1.2.1.2.2 FC (*Folin-Ciocalteu reducing capacity*)

Esta técnica baseia-se na quantificação dos compostos fenólicos, através da utilização do reagente de Folin (constituído por uma mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico).¹¹² Na presença de agentes redutores (compostos fenólicos), este reagente é reduzido, formando complexos azuis que podem ser detetados a 750-765 nm. A intensidade de absorção é proporcional à quantidade total de compostos fenólicos.¹¹³ Normalmente, o ácido gálico é utilizado como padrão de referência e os resultados são expressos em equivalentes de ácido gálico. Recentemente este ensaio foi proposto para a medição da capacidade antioxidante total, visto que alguns autores afirmam que o reagente de Folin não é específico para os compostos fenólicos, uma vez que pode ser reduzido por muitos compostos não fenólicos.^{91, 94, 113}

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Vantagens: ^{63, 67, 91, 114}

- é um método prático e acessível, visto que o reagente está disponível comercialmente;
- é útil na caracterização e padronização de amostras desde que as devidas limitações do método sejam controladas;
- é um método reprodutível e encontra-se bastante normalizado e
- a absorção do produto a um comprimento de onda longo minimiza interferências da matriz da amostra.

Desvantagens: ^{91, 115-117}

- este método sofre interferência de diversas substâncias (compostos não fenólicos), que obriga à sua remoção ou consideração nos resultados.
- não é possível avaliar a contribuição de compostos antioxidantes que não atuam através do mecanismo de TE e
- esta técnica exige a realização em fase aquosa, visto que não é possível a sua aplicação em matrizes lipofílicas.

1.2.1.3 Métodos baseados no mecanismo de TE e TAH

1.2.1.3.1 ABTS (2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid))

Neste ensaio, o composto ABTS é oxidado a radical catião ABTS por radicais peróxilos ou outros oxidantes. O radical catião ABTS, que é um composto intensamente colorido, é reduzido na presença de compostos antioxidantes. A capacidade antioxidante é avaliada através da redução da cor da reação.¹¹⁸ Relativamente ao comprimento de onda de determinação, o cromóforo possui uma absorção máxima a 414, 645, 734 e 815 nm, no entanto é preferível a determinação a 734 nm. Os resultados são expressos em equivalentes de Trolox uma vez que este é normalmente utilizado como padrão de referência.^{63, 119, 120}

Vantagens:^{27, 91, 121-126}

- é uma técnica simples;
- o radical catião ABTS reage rapidamente com antioxidantes (no máximo 30 minutos);
- pode ser usada numa vasta gama de pH e permite estudar os efeitos deste nos mecanismos antioxidantes;
- o radical ABTS não é afetado pela força iónica promovendo a sua solubilidade tanto em solventes orgânicos como aquosos, o que permite a determinação da capacidade antioxidante tanto em matrizes hidrofílicas como lipofílicas;
- esta técnica pode ser automatizada e adaptada à metodologia de microplacas, de injeção em fluxo, e de fluxo interrompido e
- o radical ABTS não é encontrado nos mamíferos e por isso representa uma fonte de radicais "não fisiológica".

Desvantagens:^{91, 127}

- o kit comercial é dispendioso pois o custo do reagente é aproximadamente nove vezes superior ao reagente utilizado na técnica ORAC;
- algumas reações podem ser mais lentas e a utilização de um ponto final de curta duração (4 ou 6 minutos), pode ocasionar uma leitura antes da conclusão da reação e provocar resultados falsamente baixos e
- necessita de preparação prévia (pelo menos 16h).

1.2.1.3.2 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical)

Este ensaio consiste na utilização do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Este composto é um dos poucos radicais orgânicos estáveis de azoto. Encontra-se disponível comercialmente e não existe a necessidade de ser produzido previamente, o que se verifica na técnica anterior. O radical é um cromóforo púrpura que através dos compostos antioxidantes é reduzido a hidrazina, que corresponde a uma cor amarelo pálido.¹²⁸ A capacidade antioxidante pode ser determinada por medição do decréscimo da absorvância a comprimentos de onda na gama 515-528 nm¹²⁹ ou por ressonância do spin eletrónico.¹³⁰

Vantagens:⁹¹

- é um teste simples e rápido e
- apenas exige um espectrofotómetro de ultravioleta-visível, o que explica o seu amplo uso na triagem da capacidade antioxidante.

Desvantagens:^{91, 131}

- a redução da cor da reação pode ser provocada pela reação de TAH ou TE, assim como através de outras reações não relacionadas;
- as moléculas pequenas que possuem melhor acesso ao local de ligação do radical promovem um valor de capacidade antioxidante aparentemente superior com este teste;
- o DPPH é um radical que não possui nenhuma semelhança com os radicais peróxido altamente reativos envolvidos na peroxidação lipídica e antioxidantes que reagem rapidamente com os radicais peróxido podem reagir lentamente com o DPPH ou até mesmo serem inertes.

1.2.2 Métodos instrumentais

Para proceder à determinação dos compostos fenólicos assim como para avaliar a capacidade antioxidante, as técnicas instrumentais normalmente utilizadas são a espectrofotometria de ultravioleta-visível (UV-VIS), a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia gasosa (GC).²³

1.2.2.1 Espectrofotometria de ultravioleta-visível

Os métodos espectrofotométricos são utilizados há cerca de 40 anos e continuam a desfrutar de grande popularidade graças às suas inúmeras vantagens.^{132, 133}

Especificamente, a espectrofotometria do ultravioleta (UV) e visível (VIS) (figura 6), acoplada a outras técnicas ou de forma isolada, é um dos métodos mais utilizados para a quantificação de diversos tipos de analitos.²³ Este método baseia-se na interação de uma solução com a radiação da zona do visível e/ou ultravioleta do espectro e na determinação da absorção/transmissão de radiação que ocorre.¹³⁴ A concentração de uma determinada substância em solução corresponde à radiação absorvida ou transmitida e é interpretada através de um espectro que fornece a intensidade da radiação por comprimento de onda da fonte de luz.¹³⁴ Para estimar a concentração, a intensidade obtida é comparada com a intensidade promovida por uma concentração conhecida da mesma substância. Atualmente, os espectrofotômetros utilizam detetores do tipo CCD (*charge-coupled device*) ou fotodíodos do tipo PDA (*photodiode array*) para substituir os fotomultiplicadores e fotodíodos dos espectrofotômetros convencionais.¹³³ Graças à combinação de uma boa sensibilidade, alta velocidade de aquisição de espectros, baixo ruído, baixo custo e robustez, estes detetores trouxeram diversas vantagens e aumentaram ainda mais o interesse pelos métodos espectroscópicos.¹³²

Vantagens da espectrofotometria de UV-VIS:^{63, 64}

- método rápido;
- fácil operação;
- versátil;
- envolve procedimentos simples;
- possui grande exatidão e precisão;
- fácil aquisição e disponibilidade da instrumentação e
- baixo custo por determinação.

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Desvantagens da espectrofotometria de UV-VIS: ¹³³⁻¹³⁵

- difícil determinação de analitos em baixas concentrações;
- a largura da banda obtida no espectro de UV-Visível torna a técnica não seletiva;
- necessária uma preparação prévia específica da amostra para melhorar a seletividade e sensibilidade e
- requer calibrações frequentes para manter a exatidão e precisão.



Figura 6 - Espectrofotômetro de UV-VIS (adaptado de ⁴⁵)

1.2.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (figura 7) é um método instrumental de cromatografia em coluna geralmente utilizado para separar, identificar e quantificar compostos presentes numa mistura.¹³⁶

Este método utiliza uma coluna com uma fase móvel líquida onde é injetada uma amostra, e na qual os seus componentes são sucessivamente separados devido às suas diferentes interações com a fase estacionária da coluna.

Este método acoplado à detecção por espectrofotometria de UV-VIS é de ampla aplicação e promove uma eficiente quantificação de compostos fenólicos.¹³⁷ Neste caso, a espectrofotometria de UV-VIS é utilizada para detetar cada um dos componentes que chegam sucessivamente à célula de fluxo. A interpretação é efetuada com base num cromatograma que apresenta a área do pico de cada componente da amostra a diferentes tempos de retenção.¹³⁸ A área do pico depende da absorção de cada composto a um determinado comprimento de onda. Esta absorção é proporcional à concentração (massa) do composto em causa e a sua quantificação é efetuada através da comparação com a respetiva solução padrão.¹³⁷⁻¹³⁹

Os compostos fenólicos possuem uma boa absorção na região do ultravioleta mas não existe um único comprimento de onda ideal para todas as classes de compostos, visto que eles apresentam absorvância máxima em comprimentos de onda diferentes de acordo com a sua estrutura molecular.¹³⁸ Assim sendo, os comprimentos de onda são escolhidos de modo a obter-se a melhor detecção global de todos os componentes.^{138, 140}

Vantagens da HPLC: ^{25, 138, 139}

- alta resolução;
- alta sensibilidade;
- alta eficiência;
- alta reprodutibilidade e
- podem ser utilizados diferentes tipos de detetores.

Desvantagens da HPLC: ^{25, 137-139, 141}

- requer pessoal especializado;
- método demorado, do ponto de vista do tempo necessário à preparação das amostras e soluções padrão;
- eficaz na separação de monómeros, dímeros e trímeros, no entanto ainda existe dificuldade em separar estruturas oligoméricas mais complexas;

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

- existem diversas soluções padrão comercialmente disponíveis, no entanto, existem ainda bastantes que não são encontradas e
- possui alto custo por análise.



Figura 7 - Equipamento de HPLC (adaptado de ²⁸)

1.2.2.3 Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa (figura 8) é um método instrumental que possui a capacidade de separação dos componentes voláteis de uma mistura complexa.¹⁴² Este difere do método de HPLC pois utiliza uma fase móvel gasosa.¹⁴²

Relativamente à deteção e quantificação, a GC é frequentemente acoplada à espectrometria de massa, uma vez que permite a identificação de compostos com base em mais do que apenas os tempos de retenção.¹⁴³ Além disso a espectrometria de massa é especialmente útil quando se trata de pequenas quantidades de amostra e quando é imprescindível uma alta sensibilidade do método.¹⁴³

Vantagens da GC: ^{114, 142}

- alto poder de resolução;
- alta sensibilidade (superior ao método de HPLC);
- requer quantidades mínimas de soluto;
- é vantajosa para solutos que são termicamente instáveis ou possuem tempos de semi-vida curtos;
- misturas de solutos ou impurezas são geralmente separados na coluna, e por isso não é necessário uma purificação prévia;
- a variação de temperatura é muito mais facilmente efetuada num cromatógrafo do que através de outras técnicas e os extremos de temperatura e de pressão são alcançados mais rapidamente e
- a GC, especificamente a de troca de iónica, pode ser um método extremamente sensível, preciso, exato, barato e versátil.

Desvantagens da GC: ^{114, 142}

- limitada a amostras voláteis;
- requer pessoal especializado;
- pode existir alguma adsorção do soluto pelo suporte sólido da coluna, podendo afetar a sua retenção normal;
- na determinação dos compostos voláteis a fase estacionária pode interferir, se através da pressão, esta se tornar igualmente volátil e
- apesar do gás de arraste ser considerado inerte, podem ocorrer diversas interações entre o soluto e este gás.

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM
RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO



Figura 8 - Equipamento de GC (adaptado de ⁹⁵)

1.3 Espectroscopia de infravermelho próximo

Além dos métodos mencionados anteriormente é possível proceder à utilização da técnica de espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) para a quantificação das propriedades antioxidantes.

A espectroscopia NIR é um método utilizado para análise qualitativa e quantitativa, que utiliza a zona do espectro eletromagnético compreendida entre os comprimentos de onda 750 e 2500 nm ou em termos de número de onda entre 10000 e 4000 cm^{-1} .^{23, 144}

Esta radiação foi descoberta por Herschel, um astrónomo e músico, através da medição da temperatura das zonas imediatamente seguintes à zona do espectro visível.^{144, 145} Herschel denotou que na região subsequente à cor vermelha, proveniente da luz branca, a temperatura era superior. Mais tarde, esta zona viria a ser denominada de infravermelho próximo.¹⁴⁴ A radiação do infravermelho é também composta por outras zonas, nomeadamente o infravermelho médio (MIR) e o infravermelho distante (FIR), no entanto vamos dar especial atenção ao NIR (figura 9).

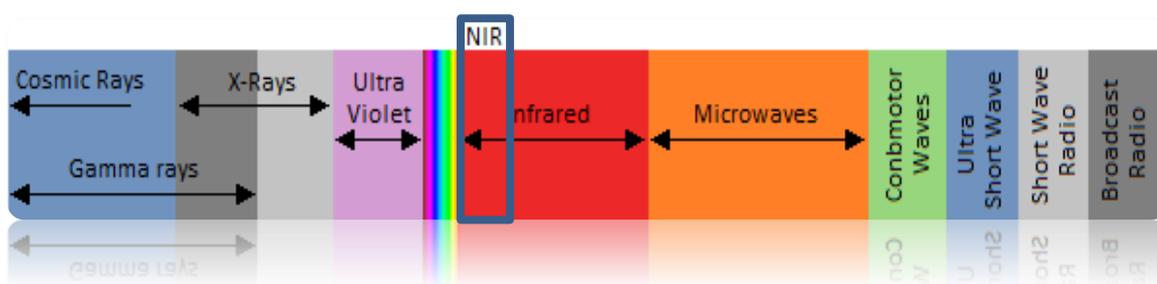


Figura 9 - Região NIR no espectro eletromagnético.

Os átomos que estão envolvidos nas ligações covalentes das moléculas deslocam-se um em relação ao outro segundo uma frequência fundamental, que é definida pela força da ligação assim como pela massa de cada um dos átomos.¹⁴⁴ Caso alguma energia seja transferida para a molécula, a sua frequência aumenta e pode provocar sobretons (*overtones*).^{144, 145} O aumento da frequência, por absorção da radiação nesta zona espectral, pode provocar o aumento da amplitude das vibrações e rotações das ligações covalentes dos grupos funcionais das moléculas.²³ No entanto, isto apenas acontece caso o deslocamento dos átomos numa vibração provoque uma alteração no momento dipolar da molécula, ou seja, caso haja a mudança de dipolo.^{144, 146} Assim, a espectroscopia NIR permite registar os comprimentos de onda em que os aumentos de amplitude das

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

vibrações e rotações ocorrem, fornecendo um espectro que é específico da molécula em causa (*fingerprint*).¹⁴⁷

Para um determinado intervalo de comprimento de onda, algumas frequências são absorvidas, outras não são absorvidas e algumas são apenas parcialmente absorvidas.¹⁴⁴ É este complexo mecanismo de absorção de energia a determinados comprimentos de onda que constitui o espectro de absorção de uma substância ou amostra.¹⁴⁴ Propriedades químicas assim como físicas das amostras possuem diversas contribuições individuais, tornando o espectro NIR rico em informação.¹⁴⁷

As absorções na região NIR (figura 10) envolvem especificamente a contribuição de três diferentes mecanismos. Os sobretons, que derivam de frequências cerca de duas ou três vezes superiores às de uma transição fundamental, as bandas de combinação que ocorre quando são excitados simultaneamente dois estados vibracionais diferentes, e as transições eletrónicas de menor importância.^{144, 148} Pela avaliação das bandas do espectro, é possível determinar os grupos funcionais dos constituintes da amostra. As principais ligações covalentes que contribuem para o espectro NIR são C-H, N-H, O-H e S-H com contribuições dos grupos C=O e C=C.^{144, 149} Esta técnica é especialmente útil na deteção de compostos com ligações a átomos de hidrogénio uma vez que os grupos com pelo menos uma ligação X-H, sendo X um heteroátomo, são os únicos capazes de gerar sobretons.¹⁵⁰ As absorções por ligações entre átomos mais pesados não são tão perceptíveis na zona NIR.¹⁴⁴

Em amostras biológicas, as ligações C-H estão associadas ao conteúdo de gordura e hidratos de carbono, as ligações N-H ao conteúdo de proteína e as ligações O-H ao conteúdo de água.¹⁵¹

A região NIR pode ser dividida na região I (800 a 1200 nm ou 12500-8500 cm^{-1}), a região II (1200 a 1800 nm ou 8500-5500 cm^{-1}) e a região III (1800 a 2500 nm ou 5500-4000 cm^{-1}). Os limites das três regiões não são rigorosos.¹⁵² Os principais grupos de interesse são o metilo, metileno e metino. O conjunto de hidrocarbonetos é determinado por dois pares de bandas fortes no primeiro sobreton e região de combinação (5900 a 5500 cm^{-1} e 4350-4250 cm^{-1}), predominantemente do metilo. Os hidrocarbonetos insaturados têm grupos C-H adjacentes a ligações duplas C=C. As vibrações C=C podem contribuir ligeiramente para as bandas de combinação e deslocar a absorção dos grupos C-H para comprimentos de onda superiores devido ao efeito nucleofílico. O grupo funcional éster produz uma ligeira banda no espectro NIR apenas no segundo sobreton perto de 4650 cm^{-1} , que pode estar escondida devido aos efeitos de grupos C-H se estes estiverem presentes. O efeito dos grupos carbonilos na vizinhança da zona de absorção dos grupo C-

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

H é muito significativo e as bandas dos grupos metileno e metilo são deslocadas para comprimentos de onda superiores.

Os álcoois e os ácidos orgânicos contêm o grupo funcional O-H que é o segundo grupo principal depois do C-H no espectro NIR. As contribuições mais significativas são combinações e sobretons dos modos de vibração, que aparecem nas zonas 5250-4550 cm^{-1} e 7200-6000 cm^{-1} . Estas bandas são fortemente influenciadas na forma, posição e intensidade pelo efeito das pontes de hidrogênio que dispersam as gamas das frequências de absorção e reduzem a intensidade da absorvância.

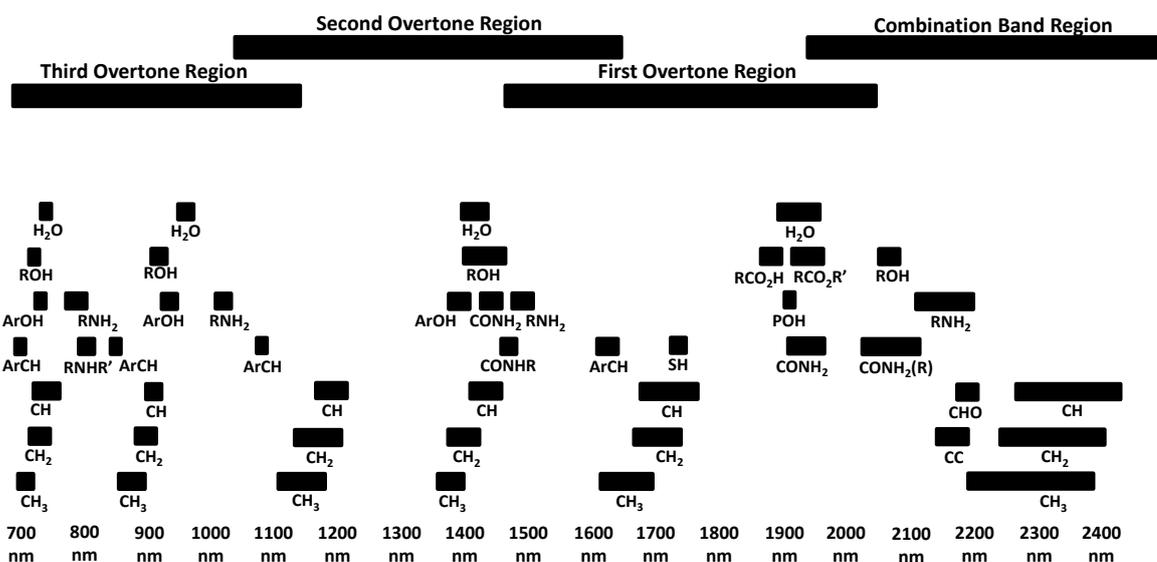


Figura 10 - Principais grupos funcionais que absorvem radiação na gama do infravermelho próximo (adaptado de ⁹²)

Os valores obtidos através do espectro NIR podem ser expressos em unidades de absorvância ou transmitância.¹⁵³ Os picos do espectro na região NIR são largos e fracos,¹⁴⁶ e é essa característica que torna esta técnica valiosa. Enquanto nas regiões vizinhas, tal como a região ultravioleta, a região do visível e outras regiões do infravermelho, a região NIR não envolve transições e transmite bem a luz promovendo uma fraca absorção e tornando o espectro mais simples.¹⁵² Esta característica está na base da possibilidade de utilização de radiação deste tipo diretamente em amostras de diferentes tipos sem qualquer processamento (p.e. utilização em modo de refletância difusa para medição de sólidos, pastas ou géis).

A quantidade de fatores que interferem com a análise NIR, tais como bandas de absorção provenientes da água, efeitos de dispersão, o ruído instrumental, a complexidade da amostra e da matriz e os efeitos ambientais, produzem um espectro complexo de difícil interpretação.¹⁵⁴ Para tratar o espectro e ser possível extrair informação relevante é utilizada a quimiometria que processa a informação espectral através de métodos

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

matemáticos e estatísticos multivariados e com recurso a computação.¹⁵⁴ Sem as ferramentas quimiométricas não seria possível obter informação qualitativa e quantitativa dos constituintes de uma amostra por NIR.¹⁴⁵ No entanto, a eficiência dos métodos quantitativos está ainda dependente da qualidade das calibrações.¹⁵⁵

Os avanços da técnica NIR e a aplicação da quimiometria, simplificou a sua utilização e permitiu a sua ampla utilização em diversas indústrias.^{156, 157}

Visto que cada tipo de material representa uma combinação de átomos única, não existe a possibilidade de dois compostos produzirem exatamente o mesmo tipo de espectro infravermelho. Assim sendo a espectroscopia NIR é extremamente útil para análises qualitativas de diferentes tipos de material (p.e. para identificação).

A espectroscopia NIR já foi aplicada em diversas áreas e está reportada na realização de diversos estudos relativos à vitivinicultura tais como, na determinação dos compostos voláteis do vinho ¹⁵⁸ e compostos voláteis de vinhos envelhecidos em carvalho ¹⁵⁹, análise de rotina de mostos e vinhos²⁵, avaliação dos parâmetros sensoriais das uvas ¹⁶⁰, determinação da glicose, etanol, ácidos orgânicos e glicerol ¹⁶¹, aminoácidos ¹⁶², minerais ¹⁶³, compostos fenólicos totais ^{159, 164, 165}, polímeros e taninos.¹⁶⁶

Após uma pesquisa exhaustiva das aplicações da técnica NIR aos resíduos da indústria vitivinícola, apenas foi encontrado um trabalho no qual se procedeu à determinação do teor de flavonóides em grainhas e à localização da respetiva vinha.¹⁶⁷ A inexistência de mais artigos demonstra que esta técnica é inovadora e pode trazer inúmeros benefícios à indústria vitivinícola devido à grande quantidade de resíduos produzidos anualmente.

Vantagens da espectroscopia NIR

O NIR é uma técnica que possui diversas vantagens em relação a outros métodos, o que tem vindo a promover um aumento da sua popularidade e conseqüentemente uma maior utilização por parte da comunidade científica. As vantagens são enunciadas seguidamente: ^{23, 144, 146, 152, 168-174}

- técnica não destrutiva e não invasiva;
- sem necessidade de processamento da amostra ou apenas uma preparação prévia simples da amostra (o que torna esta técnica menos dispendiosa e demorada);
- não requer reagentes e não produz resíduos (química verde);
- pode ser aplicada a grande número de situações e diferentes áreas;

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

- a análise pode ser realizada a amostras em diversos estados, formas e espessura, nomeadamente amostras sólidas;
- a análise pode ser executada *in-situ*;
- é uma técnica rápida e excelente para análises de rotina;
- permite medir propriedades físicas e químicas;
- analisa simultaneamente uma ampla variedade de parâmetros, utilizando técnicas multivariadas;
- possui uma precisão elevada e baixos custos de manutenção;
- permite a utilização dos componentes óticos dos equipamentos de UV-VIS (o que a pode tornar menos dispendiosa) e
- apresenta uma baixa seletividade;

Desvantagens da espectroscopia NIR:^{175, 176}

- procedimentos de calibração que podem ser trabalhosos;
- existe a necessidade de utilizar métodos multivariados para o tratamento dos dados;
- o espectro pode ser afetado por mudanças das propriedades físicas e químicas do meio;
- sensível a variações na composição da amostra (efeito de matriz);
- variações espectralis causadas por fenómenos físicos e
- baixa sensibilidade devido a baixos coeficientes de absorção.

1.4 Quimiometria

A análise de dados é parte essencial na resolução de problemas.¹⁷⁷ Durante bastante tempo, os dados foram apenas analisados através de métodos estatísticos univariados. No entanto, este tipo de análise é limitada pois apenas uma variável é medida sistematicamente para várias amostras.¹⁷⁷ O desenvolvimento da ciência assim como a necessidade de extrair mais informação dos dados químicos e de tornar a resolução dos problemas químicos mais facilmente exequível levou ao desenvolvimento de novas ferramentas de análise, dando origem à Quimiometria.¹⁷⁷

Segundo a Sociedade Internacional de Quimiometria (ICS), “a Quimiometria é a ciência que relaciona medidas realizadas num sistema ou processo químico, obtendo informações sobre o estado do sistema através da aplicação de métodos matemáticos ou estatísticos”.

A análise de dados através de métodos estatísticos multivariados permite a extração de uma quantidade muito maior de informação uma vez que estes métodos possuem a capacidade de correlacionar diversas variáveis simultaneamente.¹⁷⁷ O desenvolvimento dos computadores exponenciou a sua utilização, pois aumentou a rapidez de análise.¹⁷⁸ Bruce Kowalski propôs uma definição que traduz as vantagens desta ciência afirmando: “as ferramentas quimiométricas são veículos que podem auxiliar os químicos a se deslocarem mais eficientemente na direção de maior conhecimento”.¹⁷⁹

A quimiometria adquiriu notoriedade devido à capacidade de analisar uma enorme quantidade de dados e diversas variáveis.¹⁸⁰ Ao tornar a análise de dados mais simples e acessível, promoveu um maior interesse pela técnica NIR.¹⁸¹ Isto verifica-se atualmente na aplicação desta técnica em diversas áreas.¹⁸¹

A quimiometria permite tratar os dados amostrais e converte-los em informação útil através de vários processos. Pode ser feita uma análise descritiva/qualitativa através de métodos como a Análise de Componentes Principais (PCA) ou uma análise quantitativa através métodos tais como a Regressão por Componentes Principais (PCR) e os Mínimos Quadrados Parciais (PLS). Os dois últimos métodos permitem construir modelos de regressão para uma análise mais simples e eficiente das propriedades que se pretende determinar para o problema em questão.¹⁷⁷

Para aplicar convenientemente estas ferramentas quimiométricas é imprescindível conhece-las e ter noção da função de cada uma, para que seja possível obter as informações mais fidedignas.¹⁸² Se quimicamente a resposta não fizer sentido, o método quimiométrico foi mal aplicado ou mal planificado.¹⁸²

1.4.1 Pré-processamento dos espectros NIR

Antes de submeter os dados espectrais a este tipo de análise quantitativa e/ou qualitativa é imprescindível aplicar *a priori* uma etapa de pré-processamento dos dados.¹⁷⁸

O pré-processamento é uma etapa que introduz uma série de métodos corretivos que têm como função otimizar o conjunto dos dados com vista à análise pretendida.^{178, 183} Isto é, os espectros obtidos através da espectroscopia NIR podem ser afetados por diversos fatores físicos, tais como a dispersão da radiação devido ao tamanho das partículas da amostra, variações no percurso ótico, variações no ângulo de contacto da sonda caso exista, entre outros.¹⁸⁴ Estas interferências podem provocar ruídos nos espectros e distorções nas linhas de base, que levam a variações indesejáveis entre os espectros e dificultam a interpretação dos dados, uma vez que não estão relacionadas com o problema químico em questão.¹⁸⁵ Assim sendo, antes da análise dos espectros é imprescindível eliminar ou diminuir estas interferências para que seja possível analisar as informações mais relevantes do ponto de vista químico e conseqüentemente obter resultados credíveis e de uma forma mais eficiente.^{178, 186} Quando o objetivo da análise é determinar propriedades físicas das amostras, estas interferências são normalmente vantajosas, pois permitem determinar por exemplo o tamanho das partículas da amostra, entre outras.^{187, 188}

Os métodos de pré-processamento e a seleção dos comprimentos de onda devem ser cuidadosamente escolhidos para o objetivo que se pretende, para que informações espectrais relevantes não sejam removidas.¹⁸⁶

Existem diversos métodos de pré processamento e cada um promove diferentes transformações nos dados. Todos estes métodos pretendem simplificar a posterior construção dos modelos quimiométricos.^{178, 183} Os métodos mais aplicados são a Variação de Padrão Normal (SNV), a Correção Multiplicativa de Sinal (MSC) e métodos de derivação tal como o método de Savitzky-Golay.^{186, 189}

1.4.1.1 Método de Savitzky-Golay

A derivação dos espectros é um pré-processamento que permite aumentar a resolução dos espectros e eliminar efeitos aditivos tais como variações não desejadas na linha de base.¹⁷⁸ Esta operação consiste na derivação matemática de uma função, no qual a função é o espectro de uma amostra em vários comprimentos de onda.¹⁹⁰

Savitzky-Golay é um dos métodos de derivação mais utilizados e é conhecido por incluir uma etapa de aplicação de um filtro para redução de ruído de elevada frequência.¹⁷⁸

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Este método utiliza normalmente a primeira ou a segunda derivada do espectro original, que tem como objetivo melhorar a resolução dos picos para uma avaliação mais clara da informação existente nos espectros.¹⁹⁰ A primeira derivada tem como função primordial corrigir variações (efeitos aditivos) que ocorrem na linha de base e proporciona um maior ênfase aos picos existentes nos sinais originais.^{191, 192} A segunda derivada tem como função remover os efeitos aditivos da linha de base assim como a tendência linear, dando ênfase às variações mais acentuadas e auxiliando na resolução dos picos (ou bandas) sobrepostos (figura 11).^{178, 193}

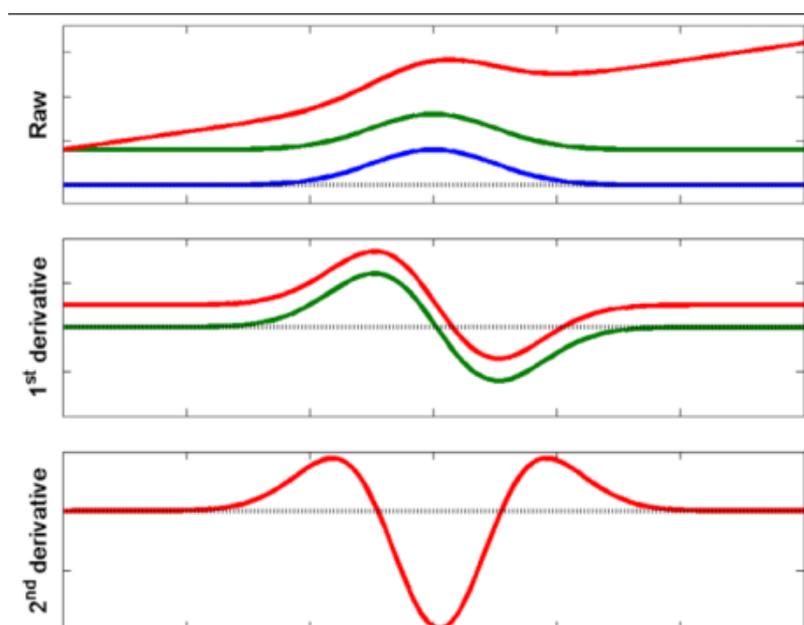


Figura 11 - Efeito da aplicação de derivadas a um espectro NIR (adaptado de ¹⁷⁸)

No entanto, ao aplicar os métodos derivativos, é necessário ter conhecimento que além da amplificação do sinal, também o ruído presente no espectro original é amplificado.¹⁹¹ Assim, o método prevê antes de aplicar a derivação, uma etapa que reduz o ruído de elevada frequência existente nos espectros.¹⁷⁸ A ideia subjacente dos métodos de suavização é selecionar uma janela do espectro com um determinado número de pontos e substituir o valor do ponto central pelo valor médio do intervalo dessa janela selecionada.¹⁷⁸ O número de pontos definidos é representado pelo valor do tamanho do filtro e esta operação é aplicada a todos os pontos do espectro sequencialmente.¹⁷⁸ Assim, o tamanho da janela influencia diretamente o resultado da aplicação do filtro (figura 12).¹⁸³

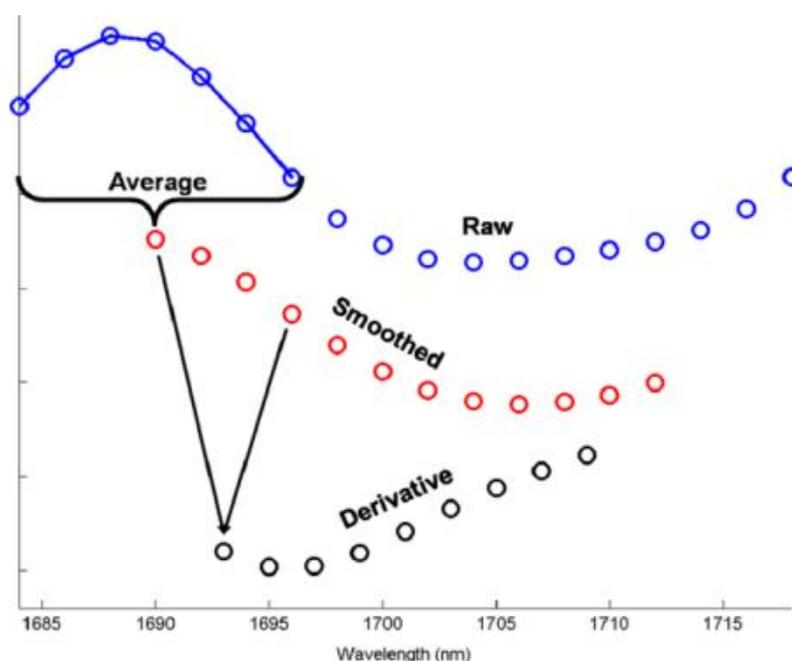


Figura 12 - Aplicação de uma janela de 7 pontos para redução do ruído num sinal (adaptado de ¹⁷⁸).

Apesar da simplicidade do funcionamento deste filtro, ele possui desvantagens quando aplicado a picos muito estreitos, visto que distorce o sinal analítico. Neste caso, quanto maior o valor da janela (número de pontos definidos), maior será a deformação do sinal.¹⁹⁴

O filtro de Savitzky-Golay é um dos métodos de redução de ruído mais utilizados e promove essencialmente o aumento da razão sinal-ruído.^{183, 190} Neste, um polinómio de baixo grau é ajustado aos pontos da janela através do método dos mínimos quadrados, permitindo recalcular o ponto central (figura 13). Esta operação torna este método menos sensível à dimensão da janela.^{183, 195}

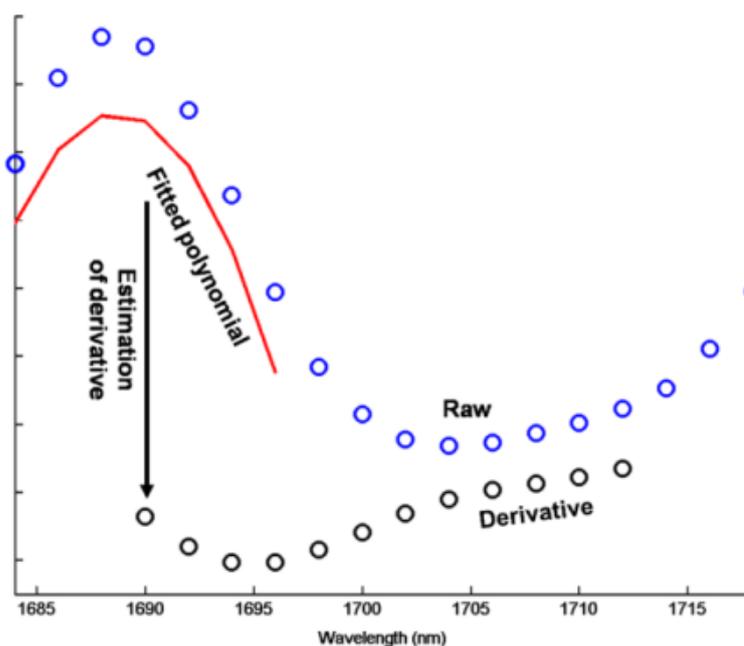


Figura 13 - Filtro de Savitzky-Golay (adaptado de ¹⁷⁸).

1.4.1.2 Correção multiplicativa de sinal (*multiplicative scatter correction*)

A correção multiplicativa de sinal (MSC) é um pré-processamento utilizado quando existem variações multiplicativas nos espectros provocadas por fenômenos físicos indesejáveis, que podem ser fonte de variações na linha de base.¹⁸³ Estes fenômenos incluem variações no percurso ótico ou efeitos de dispersão de luz que ocorrem devido a fatores como o tamanho da partícula, a rugosidade e opacidade da amostra.^{183, 185} É frequentemente utilizada em espectros medidos por refletância difusa, no qual a radiação incide diretamente na amostra, com o objetivo de remover apenas os efeitos que não trazem qualquer tipo de informação química sobre as amostras.^{183, 196} Esse método corrige principalmente a linha de base, para que os espectros correspondam o máximo possível a um espectro de referência, sendo este definido pela média do conjunto total de espectros. Deste modo, o coeficiente de dispersão da luz é igual para todos os comprimentos de onda em todas as amostras.¹⁹⁶ Neste pré-processamento, os valores da absorvância de cada ponto do espectro da amostra a é corrigido subtraindo cada ponto do espectro dessa amostra pelo valor do coeficiente linear e dividindo este valor pelo coeficiente angular (equação 2).¹⁹⁷

$$x_{c(a)} = \frac{(x_a - a)}{b} \quad (\text{Eq.2})$$

Na equação 2, $x_{c(a)}$ é o valor corrigido da absorvância em cada ponto do espectro da amostra a , x_a é o valor da absorvância em cada ponto do espectro dessa amostra e a e b são constantes estimadas a partir de uma regressão de mínimos quadrados, respetivamente o coeficiente linear e o coeficiente angular.¹⁸³

Para determinar o coeficiente angular e linear, é necessário proceder a uma regressão linear segundo a equação 3, na qual, \bar{X} é o espectro de referência obtido pela média de todos os espectros.

$$x_{(a)} = a + b \times \bar{X} \quad (\text{Eq.3})$$

Na construção dos modelos de calibração, verifica-se que o método MSC reduz o número de variáveis necessárias, simplificando o modelo de calibração e aumentando a linearidade.¹⁸⁵

1.4.1.3 Variação de padrão normal (*standard normal variate*)

A variação de padrão normal (SNV), tal como o MSC, realiza um ajuste nos espectros de modo a promover uma correção da dispersão da luz causada pela falta de homogeneidade das partículas da amostra, no entanto de forma distinta.¹⁸⁵ A SNV permite uma correção individual de cada espectro de acordo com o respetivo resultado do desvio padrão. Este método permite centrar cada espectro em torno de zero, por subtração da média das leituras espectrais e divisão pelo desvio de padrão em todos os pontos do espectro.

Embora seja semelhante ao método MSC, a determinação dos ajustes é distinta e neste caso não é utilizada a informação do conjunto total dos espectros (equação 4).

$$x_{c(a)} = \frac{(x_{(a)} - m_{(a)})}{SD_{(a)}} \quad (\text{Eq.4})$$

Na equação 4, $x_{c(a)}$ é o espectro corrigido da amostra a , $x_{(a)}$ é o espectro da amostra a inicial, $m_{(a)}$ é a média das leituras espectrais dessa amostra e $SD_{(a)}$ é o desvio padrão dessas mesmas leituras espectrais.¹⁹⁸

O SNV melhora a precisão de previsão mas não simplifica o modelo nem reduz as interferências sistemáticas e a influência da água.¹⁸⁵

1.4.1.4 Correção ortogonal de sinal (*orthogonal signal correction*)

Ao aplicar pré-processamentos aos espectros é normal que quando ocorra remoção de variação sistemática da matriz X (respostas instrumentais) seja simultaneamente removida informação da matriz Y (matriz dos parâmetros a serem determinados através do modelo). A correção ortogonal de sinal (OSC) distingue-se dos outros métodos pelo facto de ter em consideração a informação da matriz Y, removendo apenas a variação da matriz X que não está relacionada com a matriz Y.^{185, 199} Deste modo é possível realçar a informação mais relevante e construir modelos mais simples de interpretar.

A OSC é normalmente utilizada como uma etapa de pré-processamento para melhorar a construção do modelo de calibração sendo que a sua principal vantagem é reduzir o número de variáveis latentes.²⁰⁰ Há diversas formas de cálculo para a correção de espectros através da OSC, no entanto o seu fundamento é o mesmo. Encontrar forma de ortogonalizar X em Y, ou seja, determinar toda a variância de X que não se relaciona com a matriz Y e remove-la antes da construção do modelo de calibração.²⁰¹

1.4.2 Análise multivariada

A utilização de métodos computacionais acoplados à quimiometria foi um dos fatores que permitiu uma crescente implementação deste tipo de análises. O recurso aos métodos computacionais permitiu desenvolver melhorias a nível da rapidez e facilidade de análise, assim como promover uma forma mais simples e organizada de aceder aos dados e resultados.¹⁹⁶ Um dos programas computacionais mais utilizados é o Matlab (Mathworks, Natick, US) que tem como elemento básico a matriz dos dados obtidos, imprescindível para a construção de modelos de calibração.

“A calibração é definida como o conjunto de procedimentos necessários para selecionar e correlacionar, por intermédio de meios empíricos, os dados obtidos por um instrumento junto com um método de referência, de modo a que o sinal do instrumento sob calibração indique, de uma forma precisa, qualquer variação ou propriedade física da amostra”, segundo Vieira.¹⁹³

Existem diversos fundamentos que é necessário ter em conta no momento da análise quimiométrica que podem ter bastante relevância para a construção de um bom modelo de calibração, nomeadamente:²⁰²

- o grupo de calibração deve ser criteriosamente escolhido durante o próprio processo de calibração;
- para obter resultados mais fidedignos as amostras devem ser analisadas por métodos de referência;
- o grupo de calibração deve incluir amostras que provoquem grandes variações espectrais de modo a aumentar a gama de valores (p.e. de concentração) e deste modo obter um modelo mais robusto e
- para a construção do modelo deve ser utilizado um determinado número de amostras que possibilite uma determinação estatística fidedigna da relação entre as variações espectrais e a concentração.²⁰³

Existem diversos métodos quimiométricos utilizados na análise multivariada dos espectros que permitem uma interpretação do conjunto de dados. Alguns destes métodos envolvem um processo de análise qualitativa ou descritiva tal como o PCA, enquanto outros pretendem analisar quantitativamente a matriz de dados. Estes últimos são considerados métodos de calibração e previsão e têm como exemplo o método de PLS.¹⁸¹

No caso do PCA, o objetivo é avaliar a variabilidade existente entre amostras sem que seja necessário utilizar as informações sobre a natureza das amostras.^{183, 194}

No caso do PLS existe dependência da utilização de informações sobre a natureza das amostras, de modo a que seja desenvolvido um modelo fundamentado nas informações das propriedades das amostras.^{183, 194}

1.4.2.1 Análise de componentes principais (*principal component analysis*)

A PCA é um dos métodos quimiométricos mais utilizados.¹⁷⁷ Este método, permite visualizar a estrutura da matriz de dados e encontrar semelhanças e discrepâncias entre amostras, detetar tendências, identificar amostras atípicas ou *outliers* (amostras que não se encaixam no modelo) e reduzir a dimensão do conjunto de dados.¹⁸³ A redução da dimensão do conjunto de dados passa por representar os dados num novo sistema de eixos promovendo a visualização da natureza multivariada dos dados em poucas dimensões.²⁰⁴ Através da PCA, os espectros originais são reduzidos a um determinado número de fatores que expressam as variações principais destes espectros. De acordo com as variâncias observadas, a informação é organizada segundo conjuntos mais restritos de informação denominados componentes principais (CP). O primeiro CP é definido como o agrupamento que reúne os fatores com a maior quantidade possível de variância. O segundo componente principal é definido da mesma forma retirando-se apenas a variância já implícita no primeiro componente e assim sucessivamente.¹⁷⁷ Matematicamente, cada componente principal é constituído pela combinação linear das variáveis originais e pode ser definido pelo produto entre “*loadings*” (L) e “*scores*” (S). Os “*loadings*”, também denominados de pesos, representam os coeficientes dessa combinação linear e por isso a sua avaliação permite determinar quais as variáveis que mais contribuem para a geração dos “*scores*”. Os “*scores*” representam a projeção das amostras no espaço de menor dimensão definido pelos “*loadings*”.¹⁷⁷

O primeiro componente principal (CP1) é então definido como $\mathbf{CP1}=\mathbf{S}_1\mathbf{L}_1^T$ e corresponde à maior variância no espaço multivariado. $\mathbf{R}_1=\mathbf{X} - \mathbf{S}_1\mathbf{L}_1^T$ é o resíduo da matriz \mathbf{X} , que representa toda a informação que existe no conjunto de dados exceto no CP1. O segundo componente principal é definido como $\mathbf{CP2}=\mathbf{S}_2\mathbf{L}_2^T$, e é ortogonal à primeira componente principal. $\mathbf{R}_2=\mathbf{R}_1-\mathbf{S}_2\mathbf{L}_2^T$ é o resíduo deixado pelo $\mathbf{CP1}$ e pelo $\mathbf{CP2}$.¹⁹⁵ Os componentes subsequentes seguem o mesmo padrão sendo sempre ortogonais a todas elas e seguem sempre no sentido da maior variância. Deste modo é possível fazer uma interrupção na sequência dos componentes principais e manter um pequeno número destes uma vez que já correspondem a uma fração significativa da informação total contida no conjunto de dados.¹⁹⁵

Em suma, o método de PCA pode ser descrito através da equação 5:

$$X = S \times L^T + R \quad (\text{Eq.5})$$

Na qual a matriz de dados X pode ser definida pela soma dos componentes principais ($S \times L^T$) com os resíduos (R), correspondente à informação não redundante.¹⁹⁵

O símbolo T sobrescrito é o operador que permite transpor a matriz dos *Loadings*.

1.4.2.2 Mínimos quadrados parciais (*partial least squares*)

A calibração multivariada tem como função estabelecer uma relação entre uma propriedade que pode ser medida com uma determinada propriedade de interesse através de modelos matemáticos. Ou seja, através deste tipo de calibração é possível estabelecer um modelo que permita determinar propriedades de amostras desconhecidas através do seu espectro.¹⁷⁷ O método dos mínimos quadrados parciais (PLS) é precisamente um desses modelos de calibração multivariada que se baseia na utilização de variáveis latentes.²⁰⁵ É análogo ao método de PCA, no entanto, ao invés de utilizar apenas as informações espectrais das amostras (variáveis X), este método utiliza simultaneamente informações das respetivas amostras (variáveis Y) que podem ser por exemplo concentrações de analitos ou outro tipo de propriedades, inclusive qualitativas.²⁰⁴ Os espectros são organizados individualmente segundo uma matriz X , que possui os dados das variáveis independentes x , onde cada linha representa uma amostra e contém as respetivas respostas para cada comprimento de onda e uma matriz Y que representa as variáveis dependentes y e corresponde às concentrações medidas através do método de referência. Para estabelecer um modelo de regressão linear, as duas matrizes são correlacionadas através dos seus "scores".²⁰⁶

Para cada matriz, obtém-se os seguintes modelos (equação 6 e 7):

$$X = S_x L'_x + R_x \quad (\text{Eq.6})$$

$$Y = S_y L'_y + R_y \quad (\text{Eq.7})$$

Onde S corresponde à matriz de "scores", L aos "loadings", e R aos erros ou falta de ajuste do modelo.

A função primordial deste método é encontrar uma relação linear entre os "scores" dos blocos X e Y .²⁰⁷ No entanto, o ruído dos dados espectrais é independente do ruído dos dados de concentração, o que torna impossível encontrar uma relação perfeitamente linear. O PLS permite contornar este obstáculo e alcançar uma boa concordância, promovendo uma rotação dos componentes principais até que o ângulo destes seja igual a zero, o que provoca consequentemente uma alteração dos valores de "scores". Devido a

esta rotação, os componentes principais passam a ser denominados de variáveis latentes.²⁰⁷

A correlação entre os blocos X e Y pode ser definida para um determinado número “h” de variáveis latentes através de um coeficiente de regressão linear segundo a equação 8:

$$S_y h = bh \times S_x h \quad (\text{Eq.8})$$

Na qual os valores de bh correspondem aos coeficientes de regressão linear entre a matriz de “scores” de Y e de X e podem ser agrupados numa matriz diagonal B.

O número de variáveis latentes necessário para a calibração é definido através de um processo denominado de validação cruzada (“*cross-validation*”).^{177, 204}

A primeira variável latente descreve a máxima quantidade de variância das amostras e a matriz dos resíduos deverá conter apenas a variância não explicada associada ao ruído.^{204, 207}

Após a determinação do número de variáveis latentes e da construção do modelo de calibração, é possível prever a concentração de novas amostras Y_n , através dos novos “scores” S_n , dos “loadings” da matriz Y e da matriz B dos coeficientes de regressão (equação 9).

$$Y_n = S_n \times L_y \times B \quad (\text{Eq.9})$$

Estes métodos são bastante robustos uma vez que com a inclusão de novas amostras, os parâmetros do modelo de calibração mantém-se praticamente inalterados.¹⁹⁶

Hoje em dia, o método do PLS é uma ferramenta cada vez mais utilizada e extremamente útil pois pode ser empregue em diversas áreas tais como a físico-química, a química analítica, a química medicinal, a química ambiental e o controlo de processos industriais.²⁰²

1.4.2.3 Calibração

A calibração é o processo pelo qual é possível desenvolver um modelo que permita prever propriedades de interesse quando estas são medidas através de sistemas químicos tais como temperatura, espectros de infravermelho, pressão, fluxo, entre outros. Este processo correlaciona a medição instrumental obtida por estes sistemas com os valores de referência das propriedades de interesse e constrói um modelo de calibração no qual é possível estimar o valor de amostras desconhecidas de forma credível.

1.4.2.4 Validação

Para a construção do modelo de calibração é indispensável a validação do mesmo, de modo a determinar a sua eficácia para efetuar previsões. Esta validação permite garantir que os valores obtidos para a variável dependente Y, através deste modelo, correspondam o máximo possível aos valores de concentração reais obtidos através dos métodos de referência. Para a realização deste procedimento é necessário prestar atenção a dois fatores, nomeadamente, ao número de variáveis latentes a ser utilizado no modelo e a deteção de *outliers*.²⁰⁴

Uma das formas de validação baseia-se na divisão do conjunto de dados num conjunto de calibração e num conjunto de teste. O modelo de calibração é construído com as amostras do conjunto de calibração e a validação é efetuada com as restantes amostras.²⁰⁸ Após a sua construção, o modelo permite testar as amostras do conjunto de teste e comparar os resultados obtidos desta forma para a variável dependente Y com os respetivos valores reais obtidos experimentalmente. Esta comparação permite determinar a proximidade entre valores e estimar o erro que se pode obter ao utilizar este modelo de calibração para prever a concentração de amostras desconhecidas. Deste modo, a capacidade do modelo de calibração prever corretamente as concentrações é inversamente proporcional à magnitude do valor destes erros.²⁰⁸

Os erros utilizados para avaliar a capacidade de previsão dos modelos de calibração construídos, assim como para a determinação do número de variáveis latentes a ser utilizados no modelo, são baseados no cálculo do valor da raiz quadrada do erro quadrático médio (RMSE ou “*root mean squared error*”). Este cálculo é definido segundo a equação 10.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_{real,i} - y_{prev,i})^2}{N}} \quad (\text{Eq.10})$$

Na equação 10, y_{real} é o valor experimental da variável dependente para cada amostra, y_{prev} é o valor previsto pelo modelo de cada respetiva amostra e N o número total de amostras.²⁰⁹

Da mesma forma, é possível calcular a raiz quadrada do erro quadrático médio de calibração (RMSEC) através da validação do conjunto de amostras utilizadas na construção do modelo, a raiz quadrada do erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV) através da validação cruzada das mesmas e a raiz quadrada do erro quadrático médio de previsão (RMSEP) através do teste posterior com amostras externas.²⁰⁹

A detecção de *outliers* é um passo extremamente importante pois para a construção de um bom modelo de calibração, é necessário assegurar que o grupo de amostras é homogêneo, e por isso as amostras que não se encaixam devem ser eliminadas.²⁰⁴

1.4.2.4.1 Validação cruzada

Para a determinação do número de variáveis latentes a utilizar no modelo, normalmente opta-se pelo método de validação cruzada.²⁰⁴ Esta é uma forma de validação que consiste na subdivisão do conjunto de dados em vários subconjuntos. Esta validação tem como objetivo utilizar um subconjunto de amostras para efetuar a calibração e as restantes amostras para fins de validação. Este procedimento é repetido sucessivamente com novos subconjuntos até que todos os subconjuntos tenham sido validados uma vez. Desta forma é possível utilizar as mesmas amostras para construir o modelo assim como para testá-lo. Existem diferentes formas de subdividir o conjunto de dados. Uma das formas mais utilizadas, especialmente quando a quantidade de amostras não é grande, é o método *leave-one-out* (uma amostra de fora) no qual cada subconjunto corresponde a uma única amostra. Neste caso, o processo de calibração utiliza todas as amostras exceto uma delas alternadamente, que entrará posteriormente na fase de validação do modelo aplicando sucessivamente um número crescente de variáveis latentes.²¹⁰ Após as sucessivas validações, é calculado um erro médio para cada número de variáveis latentes.²¹¹ A validação cruzada é o método mais correto para definir o número de variáveis latentes a ser utilizado no modelo.²¹¹ Para isto é necessário avaliar o RMSECV correspondente a modelos com diferentes números de variáveis latentes e definir a partir de quantas, deixa de existir uma variação significativa neste valor (ou mesmo a verificação do aumento do erro).²¹¹

Depois de definido o número mais adequado de variáveis latentes é possível construir o modelo de calibração final com todas as amostras. A avaliação da eficácia do modelo de previsão é executada através de amostras externas, que não participaram na calibração.²¹¹ O valor previsto para estas amostras é comparado com o seu valor real e o RMSEP é calculado de modo a determinar a concordância entre ambos os conjuntos de valores.

Estes conjuntos de valores podem ser representados graficamente e quanto maior a concordância, maior é a proximidade dos valores à reta $y=x$. Assim, é possível utilizar o coeficiente de correlação ou coeficiente de determinação para avaliar o ajuste a esta reta.²¹¹

1.4.3 Processamento dos dados

Antes da aplicação dos dados nos modelos PCA ou PLS os dados foram sujeitos à remoção da média de acordo com o procedimento de remoção da média (*mean centring*) e à auto-normalização dos dados (*autoscale*).¹⁸⁹

1.4.3.1 Remoção da média (*mean centring*)

Cada variável possui informação com uma determinada intensidade absoluta. O objetivo da remoção da média é, tal como o nome indica, remover o valor dessa intensidade para que seja possível analisar apenas a variação dos dados em torno do valor médio e evitar que os pontos mais distantes do centro dos dados tenham mais influência que os mais próximos.^{183, 185, 212} A remoção da média é realizada através da subtração de cada elemento de cada coluna pela média de todos os elementos dessa coluna, sendo a coluna constituída pelo conjunto de amostras para uma determinada variável (equação 11). O valor médio das amostras para todas as variáveis passa a ser igual a zero.^{185, 213} Desta forma, este procedimento permite a mudança do eixo das coordenadas para o centro dos dados.¹⁹⁷

$$x_{cm(a)} = X_{(a)} - \bar{X} \quad (\text{Eq. 11})$$

Na equação 11, $x_{cm(a)}$ é o valor centrado na média da amostra a de uma dada variável, $X_{(a)}$ é o valor da amostra a dessa variável e \bar{X} é o valor médio do conjunto de todas as amostras dessa variável.²¹⁴

1.4.3.2 Auto-normalização (*autoscale*)

A auto-normalização tem como objetivo reduzir a influência de variações indesejadas presentes no conjunto de dados, como acontece por exemplo nos casos em que os dados advêm de instrumentos diferentes ou quando são medidos em diferentes unidades.^{183, 188}

Além de remover o valor da intensidade absoluta de cada variável, a auto-normalização, normaliza cada variável pela sua variância.¹⁸³ Deste modo garante-se que, independentemente da escala, todas as variáveis são equivalentes em termos de magnitude e possuem a mesma contribuição para o modelo.¹⁷⁷

Este procedimento permite apresentar os resultados segundo uma escala definida e consistente, na qual, o valor médio de cada variável é zero e a variância é 1.^{177, 180, 183}

Este procedimento é definido segundo a equação 12.

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

$$x_{ae(a)} = \frac{X_{(a)} - \bar{X}}{SD} \quad (\text{Eq. 12})$$

Na equação 12, $x_{ae(a)}$ é o valor normalizado de uma dada variável, $X_{(a)}$ é o valor da amostra a dessa variável, \bar{X} é o valor médio do conjunto de todas as amostras dessa variável e SD é o desvio padrão do conjunto de todas as amostras dessa variável.¹⁸³

O desvio padrão é definido segundo a equação 13:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_{i,(a)} - \bar{X})^2}{(n-1)}} \quad (\text{Eq.13})$$

No final todas as variáveis ficam com o mesmo peso, o que é bastante útil em métodos como o PCA ou o PLS.²⁰⁵

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes e soluções

Todos os produtos químicos utilizados têm elevada pureza e não houve necessidade de purificação. O radical catião 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), o ácido gálico e o Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) foram obtidos através da Fluka (Buchs, Suíça). O reagente de Folin-Ciocalteu, o persulfato de potássio, o acetato de sódio tri-hidratado foram obtidos através do Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), enquanto o carbonato de sódio deca-hidratado foi obtido através da Fluka (Buchs, Suíça). Para a preparação de todas as soluções foi utilizada água ultrapura do sistema Sartorius AriumPro (resistência >18.2 M Ω cm) e etanol absoluto P.A.

Para a avaliação dos CFT dos extratos de bagaço, o reagente Folin-Ciocalteu foi diluído 3:10 (v/v) em água e em Na₂CO₃·10H₂O 24,3% (m/v), o que corresponde a 9% (m/v) de carbonato de sódio. As soluções de ácido gálico (100 mg/L) foram preparadas diariamente em água. Para a determinação da CAT, a solução de radical ABTS^{•+} foi preparada através da mistura de volumes iguais de uma solução stock de ABTS (7 mM em água) com 2,45 mM de persulfato de potássio. Esta mistura foi deixada em repouso durante 12 a 16 horas no escuro à temperatura ambiente. No dia da análise, cinco concentrações diferentes de ABTS^{•+} (entre 30 e 250 μ M) foram preparadas em tampão de acetato (pH 4,6, 50 mM), com o objetivo de determinar a diluição da solução stock de ABTS^{•+} necessária para obter a concentração de radicais correspondente ao valor de absorção de 0,900 \pm 0,020 a 734 nm. As soluções de Trolox (1,0 mM) foram preparadas diariamente em solução etanólica a 50% (v/v), enquanto as soluções padrão (5,0 a 50,0 μ M) foram preparadas por diluição em água.

2.2 Resíduos de vinho

Os resíduos (películas, grainhas e engaço) utilizados neste trabalho são provenientes do processo de vinificação de uvas tintas de diversas variedades, especificamente, “Touriga Nacional”, “Tinta Roriz”, “Alfrocheiro”, e “Jaen” da Quinta dos Carvalhais (Viseu, Portugal) e foram fornecidos pela empresa SOGRAPE S.A. em Setembro de 2013 (figura 14).



Figura 14 – Resíduos (películas, grainhas e engaço) moídos

Estes resíduos foram obtidos das uvas depois de desengaçadas, esmagadas, trituradas, maceradas e fermentadas por um período de 1 a 2 dias a 18-20°C (processo de vinificação vinho tinto). As amostras de bagaço foram transportadas para o laboratório nesse mesmo dia usando uma caixa de esferovite. Uma vez no laboratório, o bagaço foi seco ao ar à temperatura ambiente e exposto à luz para simular as condições de armazenamento em adegas. O tempo de armazenamento foi definido para 1 semana, 1 mês e 2 meses após a vinificação. Para avaliar a influência de cada componente do bagaço (películas, grainhas e engaço) nos valores de CFT e da CAT e de forma a garantir a variabilidade dos resultados, foram preparadas diferentes misturas de grainhas, películas e engaço de acordo com um delineamento experimental.²¹⁵

As películas, as grainhas e o engaço foram separados manualmente e efetuaram-se as misturas pesando cada componente individualmente. De acordo com o tempo de armazenamento, as amostras de bagaço foram codificadas com as letras "A", "B" e "C", respetivamente para 1 semana, 1 mês e 2 meses (tabela 4, 5 e 6). Foram preparadas um total de 32 misturas para cada tempo de armazenamento.

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Tabela 4 - Percentagem de grainhas, películas e hastes das amostras de bagaço (1 semana)

1 semana de armazenamento	Composição do bagaço		
	% de grainhas	% de películas	% de hastes
1A	83	17	0
2A	49	51	0
3A	20	60	20
4A	20	80	0
5A	44	46	10
6A	80	20	0
7A	71	20	9
8A	44	46	10
9A	70	20	10
10A	44	46	10
11A	80	20	0
12A	22	58	20
13A	20	71	9
14A	45	45	10
15A	44	46	10
16A	60	20	20
17A	60	20	20
18A	49	51	0
19A	20	60	20
20A	70	21	10
21A	63	37	0
22A	60	20	20
23A	44	46	10
24A	20	80	0
25A	49	51	0
26A	21	69	10
27A	36	64	0
28A	20	80	0
29A	32	48	20
30A	44	46	10
31A	0	100	0
32A	100	0	0

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Tabela 5 - Percentagem de grainhas, películas e hastes das amostras de bagaço (1 mês)

1 mês de armazenamento	Composição do bagaço		
	% de grainhas	% de películas	% de hastes
1B	80	20	0
2B	48	52	0
3B	14	51	35
4B	42	58	0
5B	31	38	32
6B	82	18	0
7B	52	19	29
8B	32	18	50
9B	44	14	42
10B	59	35	6
11B	50	13	38
12B	14	54	32
13B	35	45	21
14B	27	30	43
15B	30	40	31
16B	70	17	13
17B	69	20	11
18B	64	36	0
19B	43	46	11
20B	80	13	7
21B	68	32	0
22B	51	37	11
23B	54	39	7
24B	44	56	0
25B	60	40	0
26B	13	61	25
27B	48	52	0
28B	14	66	20
29B	48	41	11
30B	28	48	24
31B	0	100	0
32B	100	0	0

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Tabela 6 - Percentagem de grainhas, películas e hastes das amostras de bagaço (2 meses)

2 meses de armazenamento	Composição do bagaço		
	% de grainhas	% de películas	% de hastes
1C	73	27	0
2C	53	47	0
3C	11	34	55
4C	55	45	0
5C	49	37	14
6C	42	20	38
7C	45	28	27
8C	35	43	22
9C	43	31	26
10C	30	41	29
11C	51	19	30
12C	37	26	37
13C	40	28	32
14C	37	40	23
15C	36	44	20
16C	38	18	45
17C	42	19	39
18C	64	36	0
19C	31	43	26
20C	49	33	18
21C	52	28	20
22C	58	18	25
23C	54	33	13
24C	66	34	0
25C	44	56	0
26C	17	39	44
27C	56	25	19
28C	58	42	0
29C	32	40	29
30C	42	40	18
31C	0	100	0
32C	100	0	0

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Neste trabalho foram adquiridos espectros NIR para misturas inteiras de bagaço (n=96) e para misturas moídas (n=96), de modo a avaliar a capacidade desta técnica para efetuar a caracterização físico-química dos resíduos inteiros assim como dos resíduos processados (figura 15). As misturas moídas foram obtidas após a moagem das misturas inteiras.

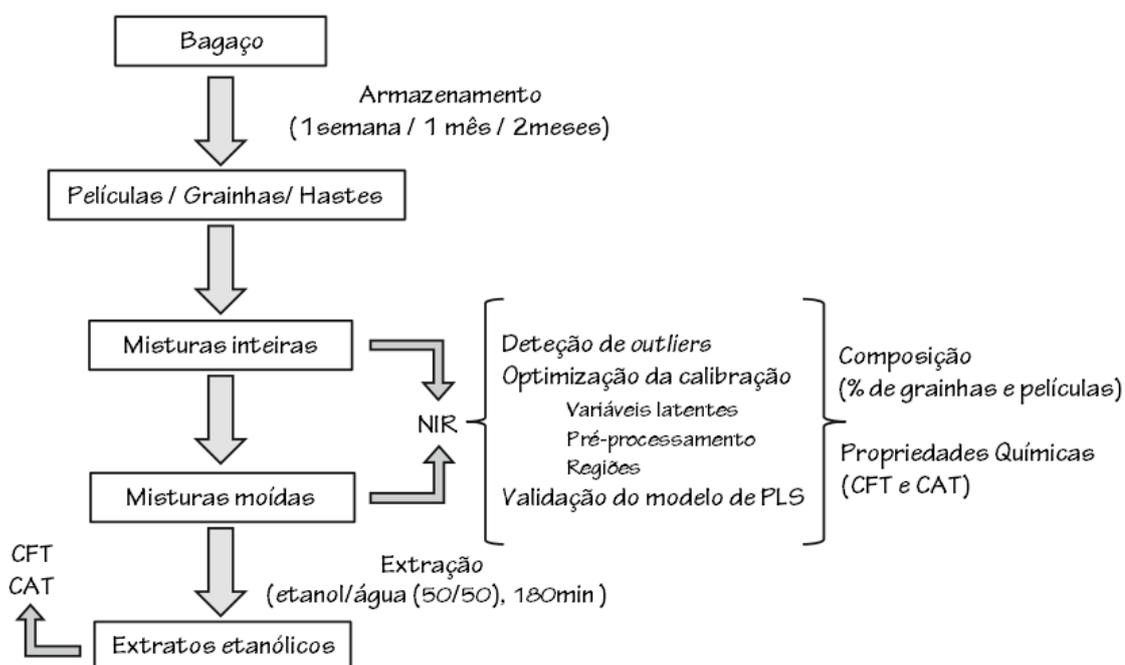


Figura 15 - Procedimento experimental para a análise dos resíduos através da espectroscopia NIR.

As análises para determinação dos CFT e da CAT foram realizadas em extratos de etanol/água (50/50, v/v). Para isso, 500 mg (de 1 semana de tempo de armazenamento) e 350 mg (de 1 e 2 meses de tempo de armazenamento) de misturas de bagaço moídas foram extraídas com 20,0 mL de uma solução etanólica num agitador orbital (GFL, tipo 3005) a 300 r.p.m. durante 180 minutos. Os resíduos de vinho foram moídos antes da extração de modo a reduzir o tamanho das partículas e aumentar o rendimento da extração fenólica e consequentemente a capacidade antioxidante.²¹⁶ A razão líquido-sólido de 25 mg/mL para as amostras húmidas (1 semana) e de 17,5 mg/mL para as secas (1 e 2 meses), esteve de acordo com outros trabalhos já realizados, que descrevem que a extração máxima de CFT utilizando etanol/água (50/50, v/v) foi obtida com 20 mg/mL.²¹⁷ A quantidade de compostos fenólicos extraídos foi medida após 60, 120, 180, 240 e 300 minutos de extração. O rendimento da extração após 180 minutos não foi estatisticamente diferente ($p > 0,05$) dos determinados em momentos de extração mais longos (dados não mostrados). Devido a este facto, 180 minutos foi o tempo selecionado para a extração de

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

CFT das amostras de bagaço moídas, o que está de acordo com os resultados publicados por Lafka et al.²¹⁶ Este procedimento de extração foi realizado em duplicado para todas as amostras de bagaço, em dois dias diferentes. Depois da extração, as amostras foram centrifugadas a 9200 g durante 2 minutos (Jouan BR4i Multifunction Centrifuge, Thermo Electronic) e a solução etanólica límpida foi diluída 100 vezes com água para a avaliação do CFT e da CAT.

2.2.1 Compostos fenólicos totais dos extratos do bagaço

O ensaio de Folin-Ciocalteu foi realizado numa plataforma de microplacas (Synergy HT, Bio-Tek Instruments) aplicando uma solução tampão de carbonato como reagente alcalino.²¹⁸ Em cada poço da microplaca foi adicionado 150 µL de extrato diluído (1:100), 50 µL de reagente de Folin-Ciocalteu (3:10, v/v) e finalmente 100 µL de solução tampão de carbonato (9% (m/v)). A redução para pH alcalino dos sais de ácidos fosfotúngstico-fosfomolibdico por compostos fenólicos dos extratos de bagaço foi monitorizada a 760 nm, a cada 10 minutos durante 120 minutos. Soluções de ácido gálico com concentrações entre 1,0 a 15,0 mg/L foram utilizadas como soluções padrão. A absorção intrínseca das amostras foi avaliada através da adição de 50 µL de HCl (0,6 M) em vez de reagente de Folin-Ciocalteu, enquanto o branco foi realizado através da adição de 150 µL de água em vez da solução padrão ou de amostra. A quantidade de CFT foi expressa como equivalentes de ácido gálico (g de ácido gálico/kg de bagaço) e determinada através do aumento da absorvância a 760 nm, do declive do ácido gálico, do volume da solução de extração (0,020 L) e da massa de amostra (entre 0,35 e 0,50 g) (equação 14).

$$\text{CFT} = \left(\frac{\Delta \text{Abs}_{760\text{nm}}}{\text{Declive do ácido gálico}} \right) \times \left(\frac{\text{Volume}}{\text{Massa de amostra}} \right) \quad (\text{Eq.14})$$

2.2.2 Capacidade antioxidante total dos extratos de bagaço

A CAT foi determinada através da capacidade de cada amostra para reduzir o ABTS^{•+} utilizando uma plataforma de microplacas.²¹⁸ Em cada poço da microplaca foi colocado 150 µL de extrato diluído (1:100) e com uma pipeta multicanal foi adicionado seguidamente 150 µL de solução de ABTS^{•+} em tampão acetato (pH 4,6, 50 mM). A diminuição da absorvância devido à redução do radical pelos compostos antioxidantes foi monitorizada a 734 nm de 30 em 30 minutos durante 5 horas. Soluções de Trolox com concentrações entre 5,0 a 50,0 µM foram utilizadas como soluções padrão. A estabilidade

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

do radical na monitorização da reação, que corresponde à absorvância do ABTS^{•+} na ausência de espécies antioxidantes, foi medida através da adição de 150 µL de água em vez de amostra. A absorção intrínseca das amostras foi avaliada através da adição de 150 µL de tampão de acetato (pH 4,6, 50 mM) em vez da solução de ABTS^{•+}. Para todas as amostras, a absorção intrínseca não contribuiu significativamente para as determinações visto que os valores de absorvância foram inferiores a 0,005. Os resultados da CAT foram expressos em mM de Trolox/kg de amostra de bagaço, usando a equação 15.

$$\text{TAC} = \left(\frac{\Delta \text{Abs}_{734\text{nm}}}{\text{Inclinação do Trolox}} \right) \times \left(\frac{\text{Volume}}{\text{Massa de amostra}} \right) \quad (\text{Eq.15})$$

2.3 Aquisição espectral

Os espectros das amostras de bagaço foram obtidos em modo de refletância difusa num espectrómetro de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FTLA 2000, ABB, Québec, Canadá), equipado com um detetor InGaAs. A medição foi efetuada através de um acessório e esfera de integração acoplado ao equipamento (figura 16).



Figura 16 - Equipamento NIR utilizado

Cada espectro foi armazenado como sendo a média de 64 espectros com uma resolução de 8 cm^{-1} ao longo de um intervalo de números de onda entre 10000 e 4000 cm^{-1} . O equipamento foi controlado através do programa Bomen Grams (versão 7, ABB, Québec, Canada). Para a aquisição dos espectros, as amostras de bagaço foram introduzidas em frascos de borossilicato e posteriormente colocadas no acessório rotativo do espectrómetro, de modo a assegurar medições mais representativas e homogêneas (principalmente para as amostras inteiras). Analisou-se um total de 192 amostras, especificamente 96 inteiras e 96 moídas. A cada 2 horas foi efetuado um branco, utilizando um material de referência (Teflon). Obtiveram-se três espectros por cada amostra e a respetiva média foi utilizada para a análise posterior. Para remover as variações espectrais indesejadas provocadas por desvios da linha de base, efeitos de dispersão de luz, e variações de temperatura, efetuou-se um pré-processamento espectral através da aplicação de um filtro Savitzky-Golay (filtro de 15 pontos, polinómio de segunda ordem e primeira derivada), seguido da aplicação da SNV.²¹⁹ O filtro de Savitzky-Golay e a primeira derivada foram aplicados a cada espectro. Posteriormente, os comprimentos de onda que não foram considerados na análise foram removidos e foi aplicado o método de SNV.¹⁷⁸

2.4 Análise multivariada

Os métodos selecionados para a análise de dados foram o PCA²²⁰ e PLS.²⁰⁶

A detecção de possíveis *outliers* foi realizada através da aplicação do método de PCA e com o auxílio das estatísticas *Hotelling T²* e soma do quadrado dos resíduos. Os modelos relativos à composição do bagaço a nível da percentagem de películas e grainhas, da determinação dos CFT e da CAT, foram realizados através do método PLS. O algoritmo preferido foi o PLS1 que significa que foi realizado um modelo individual para cada parâmetro. Uma das alternativas seria utilizar o algoritmo PLS2, no qual seria efetuado um modelo para todos os parâmetros em conjunto.²²⁰ Para a construção do modelo através do método PLS, as 96 amostras disponíveis foram divididas aleatoriamente em dois conjuntos: um destinado à calibração do modelo que utilizou 70% das amostras (um total de 67 amostras) e o outro destinado ao teste independente que utilizou 30% das amostras (um total de 29 amostras). Após a divisão, o modelo de calibração dos espectros NIR foi analisado através do método de PCA. O conjunto de teste dos espectros foi analisado utilizando as estatísticas *Hotelling T²* e soma do quadrado dos resíduos para garantir que todas as amostras do conjunto de teste estão cobertas pela variação presente nas amostras de calibração. Visto que os dados amostrais cobrem diferentes períodos de tempo de armazenamento, é indispensável que as amostras para validação e as amostras para calibração estejam na mesma proporção para cada um dos tempos.²²⁰ A matriz independente X (constituída pelos espectros) e a matriz dependente Y (constituída pelos parâmetros medidos através dos métodos de referência) foram centradas na média antes da aplicação do método de PLS. A otimização da calibração do modelo (tal como a seleção do melhor número de variáveis latentes) foi realizada através do método de validação cruzada (“*random subset*”) com um conjunto aleatório de oito divisões dos dados amostrais e 30 iterações.²²¹ Após a seleção do número de variáveis latentes (RMSECV mínimo) o conjunto de teste foi analisado através do RMSEP, do R^2_p e do RER. O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado de modo a comparar os valores experimentais com as estimativas do conjunto de teste. Os modelos foram validados através do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson e do parâmetro RER para o conjunto de teste, definida na equação 16. O parâmetro RER é um bom indicador para avaliar a eficácia do modelo preditivo, visto que permite relacionar a variação do componente de interesse do conjunto de teste com o respetivo RMSEP.^{222, 223} Valores de RER superiores a 10 unidades indicam que os modelos respondem adequadamente aos parâmetros em causa.²²³

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

$$RER = \frac{(y_{\max} - y_{\min})}{RMSEP} \quad (\text{Eq.16})$$

Na equação 16, o y_{\max} e y_{\min} são os valores máximos e mínimos, respectivamente, de cada parâmetro utilizado na calibração. Para os espectros de amostras inteiras e para as moídas foram efetuados diferentes modelos de calibração PLS.

Todos os cálculos foram realizados em Matlab versão R2009b (MathWorks, Natick, MA, EUA), com a PLS Toolbox versão 5.5.1 (Eigenvector Research, Inc., WA, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante total do bagaço

A determinação dos compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante total é o ponto de partida para a caracterização química de extratos de bagaço.⁵ Ambas as determinações foram efetuadas em extratos etanólicos do bagaço considerando diferentes tempos de armazenamento (tabela 7).

Tabela 7 - Valores de CFT e CAT obtidos para os extratos de bagaço para diferentes tempos de armazenamento

Armazenamento	CFT (g ácido gálico/kg de amostra)			CAT (mmol Trolox/kg de amostra)		
	Média±SD	Min.	Máx.	Média±SD	Min.	Máx.
1 semana	13.4±1.4	11.0	15.8	153±14	129	175
1 mês	31.8±4.2	25.3	42.5	304±35	243	394
2 meses	32.3±4.0	21.3	40.4	321±32	222	408

Nota: SD corresponde ao desvio padrão

Os CFT e a CAT das amostras de bagaço armazenadas durante 1 mês à temperatura ambiente foram considerados estatisticamente maiores do que as armazenadas durante 1 semana ($p < 0,05$) mas não podem ser considerados distintos das amostras armazenadas durante 2 meses ($p > 0,05$). A diferença nos valores de CFT e CAT é explicado pela humidade elevada presente nas amostras com 1 semana de armazenamento. Para as amostras com 1 e 2 meses de armazenamento já não se verifica essa diferença. Assim, o rendimento da extração fenólica por massa de bagaço não aumenta em amostras com tempo de armazenamento superior a 1 mês à temperatura ambiente. Para as amostras de bagaço armazenadas durante 1 mês, o valor de CFT variou entre 25,3 e 42,5 g de ácido gálico/kg, enquanto o valor de CAT variou de 243 a 394 mmol Trolox/kg. Na literatura foram descritos valores semelhantes, nomeadamente 32,6 a 74,7 g de ácido gálico/kg e 193 a 485 mmol Trolox/kg para o CFT e a CAT, respetivamente, para bagaço proveniente de variedades de uva produzidas no Brasil.²²⁴ Foram verificadas correlações positivas altas entre o valor de CFT e de CAT para 1 semana de armazenamento ($R=0,963$ e $n=32$), para 1 mês ($R=0,980$ e $n=32$), para 2 meses ($R=0,832$ e $n=32$) e considerando todas as amostras

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

($R=0,987$, $n=96$). Esta correlação também foi evidenciada por outros autores para o bagaço, películas e grainhas provenientes do processo de vinificação.^{224, 225}

A determinação de CFT foi efetuada para películas e grainhas individualmente e para misturas com uma proporção de 50% de películas e 50% de grainhas em cada período de armazenamento (figura 17).

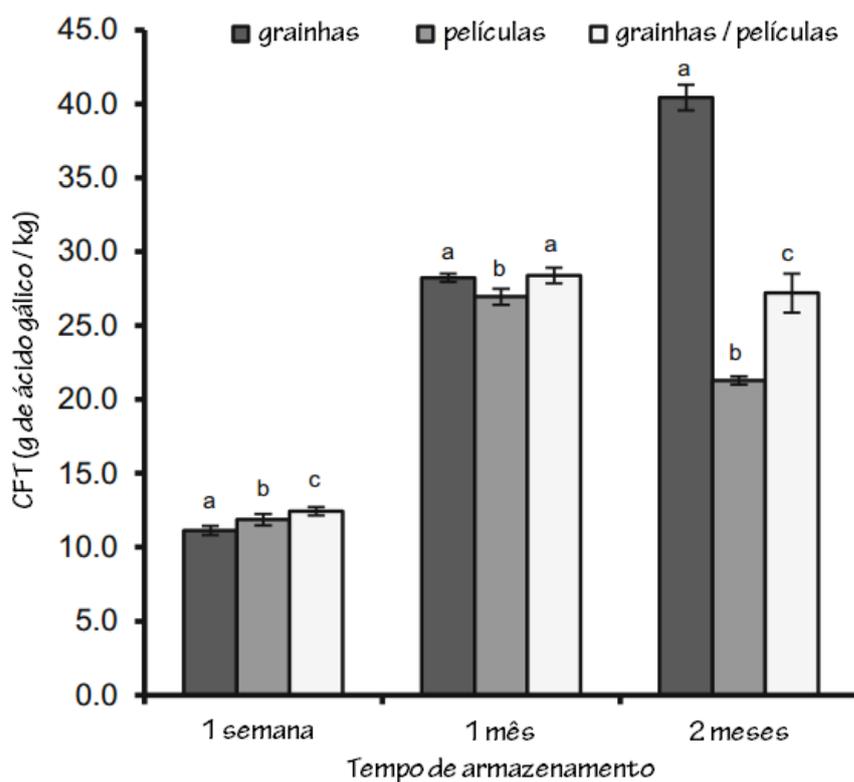


Figura 17 - Determinação dos CFT das grainhas, películas e da mistura de grainhas e películas em cada tempo de armazenamento. Os resultados correspondem à média \pm o desvio padrão de duas análises realizadas em quadruplicado. As diferentes letras de cada tempo de armazenamento indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). As amostras das misturas de grainhas /películas usadas foi a 18A, 2B e a 2C para 1 semana, 1 mês e 2 meses, respetivamente.

Após 1 mês de armazenamento, a quantidade de CFT por kg de amostra, para todos os componentes de bagaço, aumentou quando comparada com o período de armazenamento de 1 semana. Entre 1 e 2 meses de armazenamento, o valor de CFT da película diminuiu de $27,0 \pm 0,5$ para $21,3 \pm 0,3$ g de ácido gálico/kg, enquanto o valor de CFT da grainha aumentou de $28,2 \pm 0,3$ para $40,4 \pm 0,9$ g de ácido gálico/kg. A diminuição dos CFT da película deve-se à oxidação das antocianinas predominantemente presentes neste componente do bagaço e o aumento dos CFT nas grainhas deve-se à sua

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

maior resistência aos processos de desidratação e de oxidação.²²⁵ Foram obtidos valores semelhantes para as misturas compostas por aproximadamente 50/50 % de películas e grainhas para os períodos de armazenamento de 1 e 2 meses ($28,4 \pm 0,5$ e $27,2 \pm 1,3$ g de ácido gálico/kg, respetivamente). É possível concluir que as grainhas possuem uma maior quantidade de CFT por peso de amostra seca do que a película da uva. Após 2 meses de armazenamento, foi observada uma tendência semelhante a nível da CAT das grainhas, das películas e da mistura de ambas, respetivamente 408 ± 2 , 222 ± 4 , e 295 ± 13 mM Trolox/kg. Estes resultados estão de acordo com a literatura, que evidencia que extratos de grainhas da uva possuem maior quantidade de compostos fenólicos e uma maior capacidade antioxidante do que os extratos de película da uva.^{225, 226} Este facto deve-se à presença de maior quantidade de flavanol, ácido gálico e proantocianidinas da grainha. Outra justificação é o facto de que as grainhas são ricas em flavanóis esterificados com ácido gálico que possuem elevada capacidade antioxidante.³³ Assim sendo é possível afirmar que os resíduos de bagaço, especialmente as grainhas, representam uma fonte rentável de compostos bioativos com potencial aplicação em outras indústrias.

3.2 Espectros NIR do bagaço

Os modelos de PCA realizados com base nos espectros NIR das amostras inteiras e das moídas capturaram 99% da variância total em três componentes principais. Através da análise das estatísticas *Hotelling T²* e soma do quadrado dos resíduos, foi possível confirmar a ausência de *outliers*.²²⁰ Assim sendo, todas as amostras foram consideradas nas análises posteriores.

Os espectros das amostras de bagaço inteiras e moídas apresentaram diferenças substanciais entre os diferentes tempos de armazenamento, tal como esperado (figura 18a, b). Os espectros revelaram uma diminuição do sinal de absorvância ao longo do período de armazenamento devido à perda de água. Esta redução da absorvância pode ser observada na região 2 e 4 da figura 18a, b.

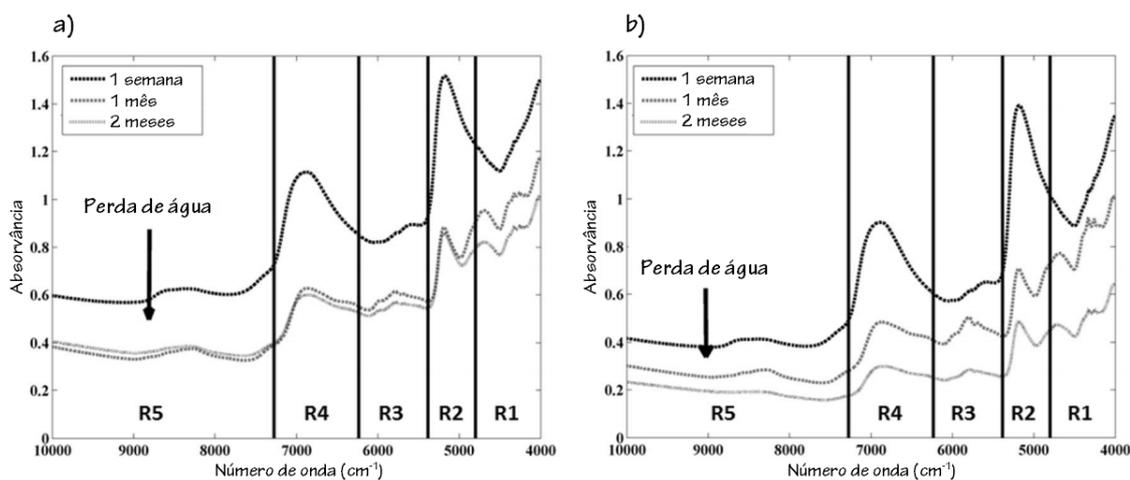


Figura 18 – Exemplo de espectros NIR da mistura de grainhas, películas e hastes obtidos para as amostras de bagaço inteiras (a) e moídas (b) nos diferentes tempos de armazenamento: R1 (4800-4035cm⁻¹), R2 (5385-4800cm⁻¹), R3 (6235-5385cm⁻¹), R4 (7275-6235cm⁻¹) e R5 (9975-7275cm⁻¹).

3.3 Modelo da composição do bagaço e da respetiva capacidade antioxidante

Antes da construção dos modelos de PLS para ambos os conjuntos de amostras, os espectros NIR foram divididos em regiões segundo os seguintes números de onda: 4800-4035 (R1), 5385-4800 (R2), 6235-5385 (R3), 7275-6235 (R4), e 9975-7275 cm^{-1} (R5). Esta divisão foi efetuada devido à localização das bandas de água (R2 e R4) que podem ter uma influência negativa sobre os modelos desenvolvidos.²²⁷ Nos espectros NIR, a informação relativa à parte química da amostra é capturada na região das bandas combinadas e do primeiro sobretom, R1 e R3, respetivamente. A informação relativa à parte física da amostra, tal como o tamanho das partículas ou a densidade, é capturada na região do segundo e terceiro sobretom, R5.²²⁸ Foram efetuados modelos de PLS considerando todas as regiões individualmente e todas as combinações possíveis entre as regiões e comparados de acordo com o RMSECV. Os melhores modelos, para avaliar os CFT e a CAT, foram obtidos utilizando a combinação das regiões R1 e R3. Este resultado foi obtido para as amostras inteiras e moídas. A região 5 proporcionou os melhores modelos para a determinação da quantidade de películas e grainhas da uva. As regiões 1 e 3 apresentam as contribuições de CH_3 , CH_2 , CH (aromático) (região das bandas combinadas) e CH_3 , CH (aromático), e SH (região do primeiro sobretom), respetivamente. A região 5 reflete as contribuições dos grupos RNH_2 , RNHR' , RCONH_2 , e RCONHR' (região do segundo sobretom).²²⁹

As tabelas 8 e 9 e as figuras 19 e 20 apresentam os resultados obtidos para os modelos PLS para as variáveis de CFT/CAT e quantidade de grainha/película, respetivamente. Os modelos PLS para as amostras moídas apresentaram melhores resultados quando comparados com os resultados obtidos para as amostras inteiras (tal como pode ser observado através do RMSEC, RMSECV, RMSEP, R^2_p , e RER) para todos os parâmetros (CFT, CAT e percentagem de grainha e película) e utilizaram um menor número de variáveis latentes. Este facto pode ser explicado pela maior homogeneidade das amostras moídas. Apesar da utilização de um acessório de rotação para assegurar medições mais representativas e homogéneas das amostras de bagaço, os modelos PLS para as amostras inteiras tiveram sempre piores resultados do que os modelos equivalentes realizados para as amostras moídas como referido anteriormente. Os RMSECV dos modelos das amostras moídas foram aproximadamente 60 a 70% inferiores ao RMSECV obtido nos modelos para as amostras inteiras.

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Tabela 8 - Resultados dos modelos de calibração obtidos para a CAT e os CFT das amostras de bagaço inteiras e moídas usando as regiões espectrais 6234-5389 e 4806-4035 cm⁻¹

Bagaço	Parâmetros químicos	Conjunto de calibração			Conjunto de teste		
		LV	RMSEC	RMSECV	RMSEP	R ² _p	RER
Inteiras	CAT (mmol Trolox/Kg de amostra)	7	21.9	27.8	24.4	0.914	10.9
	CFT (g ácido gálico/Kg de amostra)	7	2.98	3.79	2.52	0.928	10.1
Moídas	CAT (mmol Trolox/Kg de amostra)	4	14.1	19.4	14.6	0.966	18.1
	CFT (g ácido gálico/Kg de amostra)	4	1.77	2.37	2.12	0.956	14.8

Tabela 9 - Resultados dos modelos de calibração obtidos para a determinação da composição das amostras de bagaço inteiras e moídas usando a região espectral 9975-7279 cm⁻¹

Bagaço	Composição	Conjunto de calibração			Conjunto de teste		
		LV	RMSEC	RMSECV	RMSEP	R ² _p	RER
Inteiras	Grainhas (%)	4	5.75	6.97	7.20	0.885	13.9
	Películas (%)	5	5.92	8.44	7.00	0.885	14.3
Moídas	Grainhas (%)	3	4.58	5.05	5.67	0.936	15.7
	Películas (%)	5	3.94	5.18	5.35	0.914	15.0

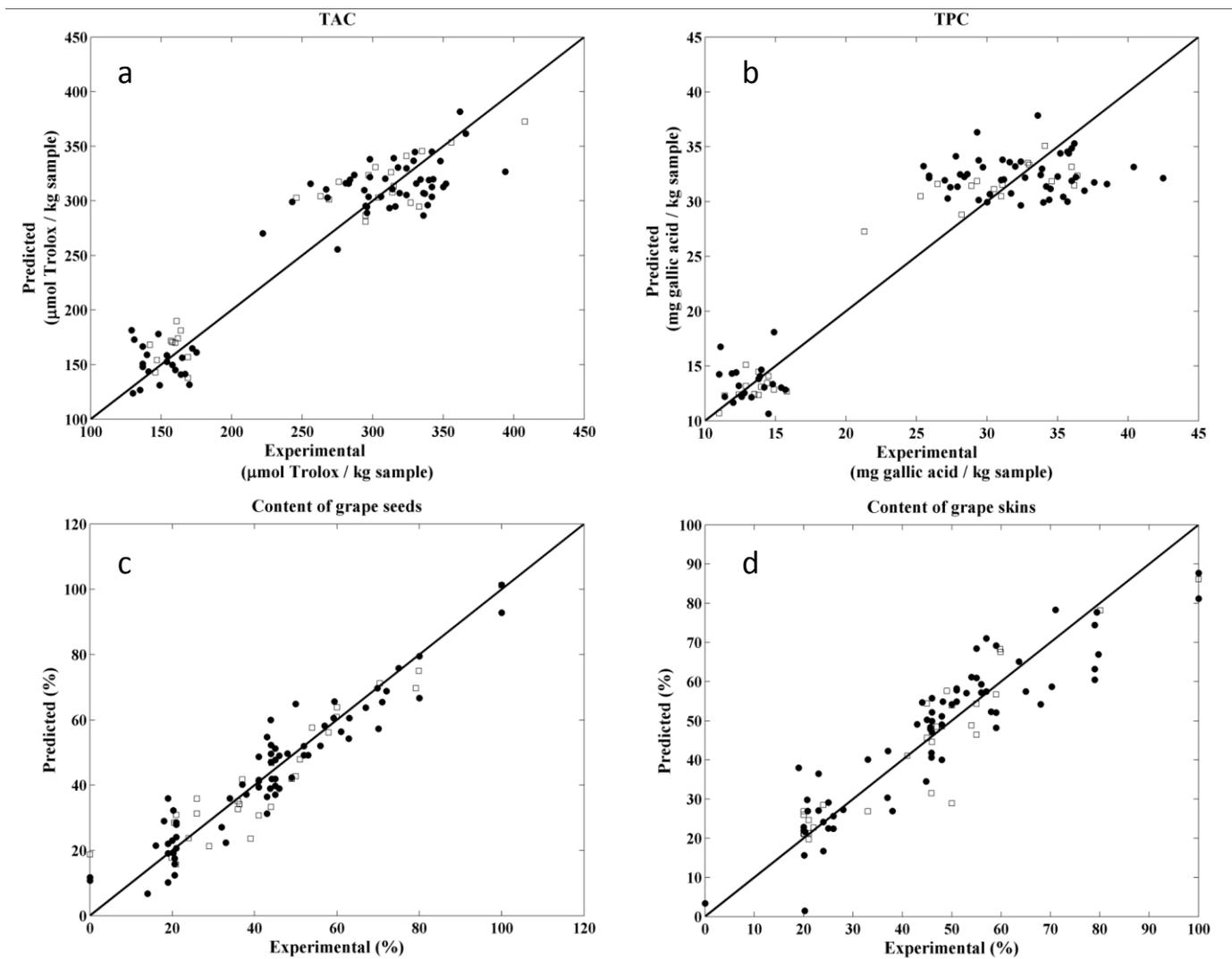


Figura 19 - Comparação dos valores experimentais e valores previstos para a validação cruzada (●) e para o conjunto de teste (□) dos modelos das amostras inteiras para o CAT (a), CFT (b), conteúdo de grainhas (c) e películas (d).

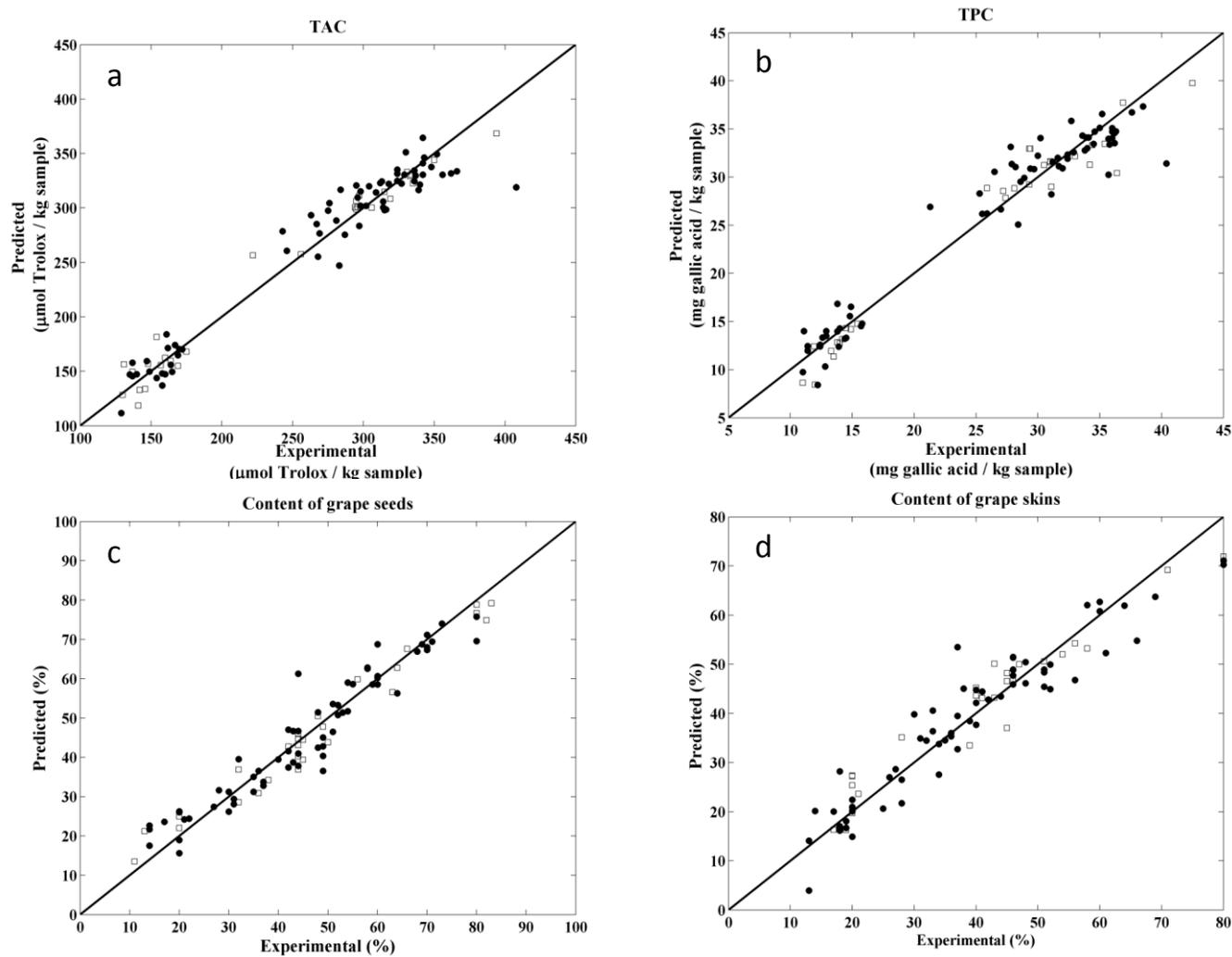


Figura 20 - Comparação dos valores experimentais e valores previstos pela validação cruzada (●) e para o conjunto de teste (□) dos modelos das amostras inteiras para a CAT (a), dos CFT (b) e do conteúdo de grainhas (c) e películas (d).

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Os conjuntos de teste foram projetados nos modelos desenvolvidos e demonstraram que estes respondem adequadamente a todos os parâmetros estudados nas amostras moídas e inteiras (valores de RER acima de 10 em todos os parâmetros). Obtiveram-se sempre melhores modelos de PLS para as amostras moídas. Assim os modelos PLS utilizando as amostras moídas apresentaram menor RMSEP, maior R^2_p (variando de 0,91 a 0,97) e maior RER (variando de 14,8 a 18,1). Os valores de RER e de R^2_p para os modelos das amostras inteiras variaram de 10,1 a 14,3 e de 0,88 a 0,93, respetivamente. Apesar dos modelos das amostras inteiras apresentarem resultados inferiores quando comparados com as amostras moídas, estes modelos promovem valores muito aceitáveis, demonstrando que a espectroscopia NIR pode ser aplicada a amostras inteiras para estimar de forma eficaz os CFT, a CAT e a quantidade de películas e grainhas sem que exista necessidade de processar as amostras.

Para os valores dos CFT e da CAT, foram construídos modelos para cada tempo de armazenamento. Os resultados obtidos para as amostras moídas (tabela 10) comprovam que a técnica NIR tem a capacidade de prever os valores de CFT e da CAT apesar do baixo número de amostras ($n=32$, para cada modelo) e da baixa gama de valores de CFT e da CAT dentro do mesmo período de armazenamento.

Tabela 10 - Resultados dos modelos de calibração obtidos nos três tempos de armazenamento, para a CAT e os CFT das amostras de bagaço moídas usando as regiões espectrais 6234-5389 e 4806-4035 cm^{-1}

Armazenamento	Parâmetros químicos	Conjunto de calibração			Conjunto de teste		
		LV	RMSEC	RMSECV	RMSEP	R^2_p	RER
1 semana	CAT (mmol Trolox/Kg de amostra)	5	6.92	8.26	5.42	0.815	7.19
	CFT (g ácido gálico/Kg de amostra)	5	0.588	0.667	0.496	0.881	7.65
1 mês	CAT (mmol Trolox/Kg de amostra)	5	11.2	15.8	11.5	0.963	12.9
	CFT (g ácido gálico/Kg de amostra)	5	1.45	1.87	0.962	0.965	16.0
2 meses	CAT (mmol Trolox/Kg de amostra)	5	8.99	14.7	12.1	0.915	14.7
	CFT (g ácido gálico/Kg de amostra)	5	1.84	2.06	1.71	0.890	10.8

Este problema é particularmente evidente nas amostras com 1 semana de armazenamento que possuem os menores valores de RER e a gama mais baixa de valores de CFT e da CAT. No caso das amostras inteiras, os modelos de calibração tiveram um desempenho inferior (dados não apresentados).

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Os coeficientes de regressão foram analisados e comparados de modo a perceber quais os números de onda que têm maior contribuição para os modelos de calibração. Os números de onda que tiveram maior contribuição para a previsão dos valores de CFT e da TAC foram semelhantes (figura 21).

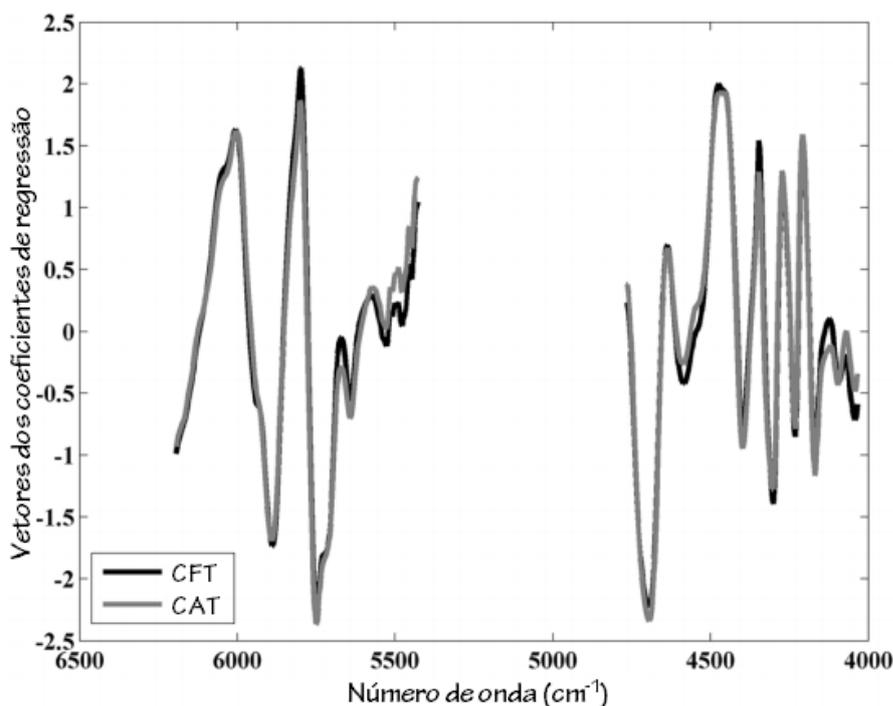


Figura 21 - Coeficientes de regressão dos modelos PLS para os CFT e a CAT das amostras de bagaço moídas.

Estes resultados eram os esperados visto que ambas as metodologias são sensíveis aos compostos fenólicos.²²⁸ Os comprimentos de onda que mais contribuem para ambos os modelos de calibração situam-se em torno de 6250-5750 e 4750-4250 cm^{-1} . As absorções em torno dos 6030 e 6060 cm^{-1} estão relacionadas com a presença de taninos²³⁰ e de compostos aromáticos,¹⁶⁷ respetivamente. Os taninos absorvem em torno de 4660 e 4360 cm^{-1} ²³⁰ e os flavonóides entre os 8000 e 6000 cm^{-1} ²³¹. Os vetores dos coeficientes de regressão obtidos para a determinação da quantidade de películas e grainhas em amostras inteiras e moídas também foram muito semelhantes. Como tal, apresenta-se apenas os vetores dos coeficientes de regressão para as amostras moídas na figura 22. A região com a maior influência para ambos os modelos situa-se entre 8750 e 7250 cm^{-1} . Esta localização está relacionada com o alongamento C-H na região do segundo sobretom. No entanto são necessários mais estudos de modo a perceber e identificar os compostos presentes nos resíduos de bagaço responsáveis por estas contribuições.

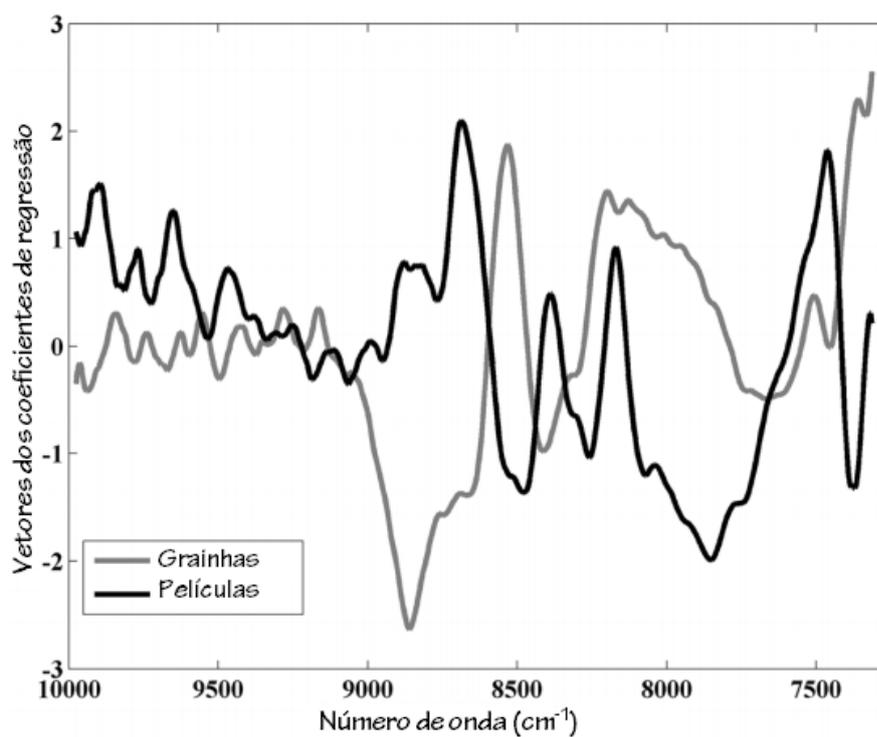


Figura 22 - Coeficientes de regressão dos modelos PLS para a quantidade de grânulos e películas das amostras de bagaço moídas.

4 CONCLUSÃO

Através deste estudo foi possível comprovar que a espectroscopia de infravermelho próximo, juntamente com o auxílio de ferramentas quimiométricas, é capaz de determinar de forma eficaz a quantidade de películas e grainhas, os compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante em resíduos vitivinícolas, com vista a potenciais aplicações industriais.

Os resultados dos modelos de calibração obtidos, baseados em modelos de mínimos quadrados parciais, evidenciaram que amostras moídas apresentaram melhores resultados em termos dos parâmetros químicos atrás mencionados e na composição em grainhas e películas do que as amostras inteiras (não processadas). No entanto, as amostras inteiras proporcionaram valores muito aceitáveis, permitindo concluir que a espectroscopia NIR é eficaz na monitorização dos resíduos com ou sem o processamento da amostra.

Através da divisão dos espectros foi possível concluir que diferentes zonas conferem diferentes informações sobre a caracterização físico-química dos resíduos. As regiões 4800-4035 e 6235-5385 cm^{-1} , que não englobam a influência das bandas de água, são as mais adequadas para a avaliação dos CFT e da CAT e a região 9975-7275 cm^{-1} é mais adequada para à caracterização física das amostras (p.e. a determinação da percentagem de grainhas e películas).

Este método instrumental apresenta vantagens exclusivas na avaliação dos resíduos, em relação a outros métodos correntemente utilizados. Contrariamente aos métodos de referência, normalmente demorados e dispendiosos, a técnica de infravermelho próximo é simples, rápida, possui um baixo custo por análise, não requer reagentes, não produz resíduos e possibilita a análise de produtos *in-situ* sem processamento da amostra. Se integrado num processo industrial pode fornecer estimativas em tempo real sendo de extrema conveniência por exemplo para fazer um *screening* rápido deste tipo de materiais. Além destas vantagens, a técnica de infravermelho próximo demonstrou mais uma vez possuir a capacidade de analisar simultaneamente vários parâmetros físicos e químicos o que a torna extremamente útil para a análise destes resíduos. Assim é possível efetuar uma avaliação rápida dos resíduos de modo a obter uma noção prévia da sua composição antes das difíceis etapas de extração dos compostos antioxidantes.

5 PERSPETIVAS FUTURAS

Em termos de perspetivas futuras são diversas as possibilidades onde a espectroscopia NIR poderá ter bastante utilidade. Relativamente à indústria vitivinícola, esta técnica poderá ser útil na determinação de compostos com elevado valor económico presentes nos resíduos e na avaliação do grau de pureza de compostos dos resíduos após a sua extração e separação. Tal como o armazenamento avaliado nesta dissertação, muitos outros fatores podem ser considerados de modo a estudar a variabilidade do comportamento dos resíduos tanto a nível físico como químico (p.e. influência do transporte na capacidade antioxidante dos resíduos).

Do mesmo modo que foi aplicada aos resíduos vitivinícolas, esta técnica pode também ser aplicada ao estudo de outros resíduos agro-alimentares de modo a permitir o seu reaproveitamento que é, hoje em dia, uma preocupação crescente na nossa sociedade. Além dos resíduos, a espectroscopia NIR pode ser extremamente útil quando aplicada à alimentação humana e animal, à área da bioenergia, às análises agrícolas (p.e. plantas, solos, fertilizantes), entre outras.

O facto da técnica NIR permitir avaliar eficazmente parâmetros relativos à composição química, propriedades físicas assim como características sensoriais, torna esta técnica uma alternativa bastante interessante para a determinação da qualidade de produtos e a sua autenticação. Desta forma, é também possível aplicar esta tecnologia a nível industrial, especificamente no controlo de processos de produção onde o *screening* rápido de produtos ou materiais seja essencial.

As características da espectrometria permitem estender a avaliação da capacidade antioxidante às uvas *in-situ* e de forma não invasiva, visto que, neste caso pode ser utilizado um equipamento portátil que permite a sua portabilidade até ao local da vinha.

Apesar da diferença entre a espectroscopia de infravermelho próximo e a espectroscopia Raman, ambas se enquadram no campo da espectroscopia vibracional com características muito similares, o que significa que esta última poderá ser também extremamente útil nas aplicações mencionadas anteriormente.

Texto redigido segundo o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa de 1990.

6 BIBLIOGRAFIA

1. Harvey M, White L, Frost W. Wine and Identity: Branding, Heritage, Terroir. First edition ed. New York: Routledge; 2014. 252 p.
2. Morgano MA, Faria CG, Ferrao MF, Bragagnolo N, Ferreira MMD. Determination of moisture in raw coffee by near infra-red reflectance spectroscopy and multivariate regression. *Ciencia Tecnol Alime.* 2008;28(1):12-17.
3. Schieber A, Stintzing FC, Carle R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds - recent developments. *Trends Food Sci Tech.* 2001;12(11):401-413.
4. Matias AA, Serra AT, Silva AC, Perdigao R, Ferreira TB, Marcelino I, et al. Portuguese winemaking residues as a potential source of natural anti-adenoviral agents. *Int J Food Sci Nutr.* 2010;61(4):357-368.
5. Fontana AR, Antonioli A, Bottini R. Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics. *J Agr Food Chem.* 2013;61(38):8987-9003.
6. Mazza G, Miniati E. Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1993. 362 p.
7. Brouillard R, George F, Fougerousse A. Polyphenols produced during red wine ageing. *BioFactors.* 1997;6(4):403-410.
8. Hosu A, Cristea VM, Cimpoiu C. Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. *Food Chem.* 2014;150:113-118.
9. Fraga H, Malheiro AC, Moutinho-Pereira J, Santos JA. Climate factors driving wine production in the Portuguese Minho region. *Agr Forest Meteorol.* 2014;185:26-36.
10. Vine RP, Harkness EM. Winemaking: from grape growing to marketplace. Second Edition ed. New York: Springer Science+Business Media; 2002. 477 p.
11. Rizzon LA, Miele A, Meneguzzo J, Zanuz MC. Effect of three processes of vinification on chemical composition and quality of Cabernet Franc wine. *Pesq agropec bras.* 1999;34(7):1285-1293.
12. Porto IDVPDed. IVDP.pt. Porto: Mercatura; 2004; Disponível em <http://www.ivdp.pt/> [acedido em 27/05/2015]
13. Garrido GS. Vinificação de uvas brancas com fermentação e conservação em barrica. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa; 2011.
14. Moreno-Arribas MV, Polo MC. Winemaking biochemistry and microbiology: Current knowledge and future trends. *Crit Rev Food Sci.* 2005;45(4):265-286.
15. Torija MJ, Beltran G, Novo M, Poblet M, Guillamon JM, Mas A, et al. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *Int J Food Microbiol.* 2003;85(1-2):127-136.
16. Volpe PLO. Study of the alcoholic fermentation of sugars diluted solutions through flow microcalorimetry. *Quim Nova.* 1997;20(5):528-534.
17. Dal'Osto MC. Emprego da maceração a frio na extração e estabilização de compostos fenólicos em vinhos de Syrah cultivada em ciclo de outono-inverno. Piracicaba: Universidade de São Paulo; 2012.
18. Mori FA, Mendes LM, Trugilho PF, Cardoso MdG. Utilização de eucaliptos e de madeiras nativas no armazenamento da aguardente de cana-de-açúcar. *Food Sci Technol Int.* 2003;23:396-400.
19. Eiriz N, Oliveira JFS, Climaco MC. Oak wood chips in the ageing of red wines. *Cienc Tec Vitivinic.* 2007;22(2):63-71.
20. Stockham K, Sheard A, Paimin R, Buddhadasa S, Duong S, Orbell JD, et al. Comparative studies on the antioxidant properties and polyphenolic content of wine from different growing regions and vintages, a pilot study to investigate chemical markers for climate change. *Food chem.* 2013;140(3):500-506.
21. Xiang L, Xiao L, Wang Y, Li H, Huang Z, He X. Health benefits of wine: don't expect resveratrol too much. *Food chem.* 2014;156:258-263.

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

22. Czyzowska A, Pogorzelski E. Changes to polyphenols in the process of production of must and wines from blackcurrants and cherries. Part I. Total polyphenols and phenolic acids. *Eur Food Res Technol.* 2002;214(2):148-154.
23. Martelo-Vidal MJ, Vazquez M. Determination of polyphenolic compounds of red wines by UV-VIS-NIR spectroscopy and chemometrics tools. *Food Chem.* 2014;158:28-34.
24. Gonzalez-Centeno MR, Jourdes M, Femenia A, Simal S, Rossello C, Teissedre PL. Characterization of polyphenols and antioxidant potential of white grape pomace byproducts (*Vitis vinifera* L.). *J Agr Food Chem.* 2013;61(47):11579-11587.
25. Ferrari E, Foca G, Vignali M, Tassi L, Ulrici A. Adulteration of the anthocyanin content of red wines: perspectives for authentication by Fourier transform-near infrared and ¹H NMR spectroscopies. *Anal Chim Acta.* 2011;701(2):139-151.
26. Kammerer DR, Schieber A, Carle R. Characterization and recovery of phenolic compounds from grape pomace - A review. *J Appl Bot Food Qual.* 2005;79:189-196.
27. Kampa M, Nistikaki A, Tsaousis V, Maliaraki N, Notas G, Castanas E. A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay. *BMC Clin Pathol.* 2002;2(1):3.
28. Jianmei Y, Ahmedna M. Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *Int J Food Sci Tech.* 2013;48(2):221-237.
29. Jurenka JS. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Altern Med Rev.* 2008;13(2):128-144.
30. Kahhat RF, Kavazanjian E. Preliminary Feasibility Study on the Use of Mono-disposal Landfills for E-waste as Temporary Storage for Future Mining. *International Symposium on Sustainable Systems and Technology (ISSST).* 2010.
31. Solyom K, Sola R, Cocero MJ, Mato RB. Thermal degradation of grape marc polyphenols. *Food chem.* 2014;159:361-366.
32. Hogan S, Canning C, Sun S, Sun X, Zhou K. Effects of grape pomace antioxidant extract on oxidative stress and inflammation in diet induced obese mice. *J Agr Food Chem.* 2010;58(21):11250-11256.
33. Gonzalez-Paramas AM, Esteban-Ruano S, Santos-Buelga C, De Pascual-Teresa S, Rivas-Gonzalo JC. Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. *J Agr Food Chem.* 2004;52(2):234-238.
34. Juntachote T, Berghofer E, Siebenhandl S, Bauer F. The antioxidative properties of Holy basil and Galangal in cooked ground pork. *Meat Sci.* 2006;72(3):446-456.
35. Landrault N, Larronde F, Delaunay JC, Castagnino C, Vercauteren J, Merillon JM, et al. Levels of stilbene oligomers and astilbin in French varietal wines and in grapes during noble rot development. *J Agr Food Chem.* 2002;50(7):2046-2052.
36. Lafka TI, Sinanoglou V, Lazos ES. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food chem.* 2007;104(3):1206-1214.
37. Saura-Calixto F. Antioxidant dietary fiber product: A new concept and a potential food ingredient. *J Agr Food Chem.* 1998;46(10):4303-4306.
38. Llobera A, Canellas J. Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. *Food chem.* 2007;101(2):659-666.
39. Sadovoy V, Silantsev A, Selimov M, Shchedrina T. An Examination of Chemical Composition and Molecular Properties of Grape Berry Skin Flavonoids. *J Nutr Food Sci.* 2011;2:1121-1127.
40. Kante K, Nieto-Delgado C, Rangel-Mendez JR, Bandosz TJ. Spent coffee-based activated carbon: specific surface features and their importance for H₂S separation process. *J Hazard Mater.* 2012;201-202:141-147.
41. Kapsak WR, Rahavi EB, Childs NM, White C. Functional foods: consumer attitudes, perceptions, and behaviors in a growing market. *J Am Diet Assoc.* 2011;111(6):804-810.
42. Silva ML, Macedo AC, Malcata FX. Review: Steam distilled spirits from fermented grape pomace. *Food Sci Technol Int.* 2000;6(4):285-300.
43. Kammerer D, Claus A, Carle R, Schieber A. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *J Agr Food Chem.* 2004;52(14):4360-4367.
44. Pinelo M, Arnous A, Meyer AS. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci Tech.* 2006;17(11):579-590.

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

45. Jara-Palacios MJ, Gordillo B, Gonzalez-Miret ML, Hernanz D, Escudero-Gilete ML, Heredia FJ. Comparative study of the enological potential of different winemaking byproducts: implications in the antioxidant activity and color expression of red wine anthocyanins in a model solution. *J Agr Food Chem.* 2014;62(29):6975-6983.
46. Bonilla F, Mayen M, Merida J, Medina M. Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chem.* 1999;66(2):209-215.
47. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Mol.* 2010;15(10):7313-7352.
48. Wong Paz JE, Muniz Marquez DB, Martinez Avila GC, Belmares Cerda RE, Aguilar CN. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from native plants in the Mexican desert. *Ultrason Sonochem.* 2014
49. Tomsone L, Kruma Z, Galoburda R. Comparison of Different Solvents and Extraction Methods for Isolation of Phenolic Compounds from Horseradish Roots (*Armoracia rusticana*). *World Academy of Science, Eng Technol.* 2012;6(64):903.
50. Naczek M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 2006;41(5):1523-1542.
51. Spigno G, Trarnelli L, De Faveri DM. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J Food Eng.* 2007;81(1):200-208.
52. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* 3^o ed. New York: Clarendon Press; 1999.
53. Halliwell B. Free Radicals and other reactive species in disease. *Encyclopedia of Life Sciences.* National University of Singapore, Singapore: Nature Publishing Group; 2001.
54. Rajalakshmi D, Narasimhan S. Food antioxidants: sources and methods of evaluation. In: Madvahi DL, Deshpande SS, Salunkhe DK, editors. *Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives.* New York: M. Dekker; 1995. p. 65-157.
55. Halliwell B, Gutteridge J. What is a free radical? *Free radicals in biology and medicine.* Oxford, UK: Clarendon Press; 1985.
56. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;899:136-147.
57. Papas AM. Diet and antioxidant status (Reprinted from *Antioxidant status, diet, nutrition, and health*, pg 89-106, 1998). *Food Chem Toxicol.* 1999;37(9-10):999-1007.
58. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008;4(2):89-96.
59. Maxwell SR, Lip GY. Free radicals and antioxidants in cardiovascular disease. *Br J Clin Pharmacol.* 1997;44(4):307-317.
60. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annual review of nutrition.* 1996;16:33-50.
61. Frank L, Massaro D. Oxygen toxicity. *Am J Med.* 1980;69(1):117-126.
62. Carocho M, Ferreira IC. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol.* 2013;51:15-25.
63. Magalhaes LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta.* 2008;613(1):1-19.
64. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 2000;63(7):1035-1042.
65. Ward JF, Blakely WF, Joner EI. Mammalian-Cells Are Not Killed by DNA Single-Strand Breaks Caused by Hydroxyl Radicals from Hydrogen-Peroxide. *Radiat Res.* 1985;103(3):383-392.
66. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5(1):9-19.
67. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med.* 1991;91(3C):2S-13S.
68. Yildirim A, Mavi A, Kara AA. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *J Agr Food Chem.* 2001;49(8):4083-4089.
69. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr rev.* 1998;56(11):317-333.
70. Sadowska-Bartosz I, Bartosz G. Effect of antioxidants supplementation on aging and longevity. *Biomed Res Int.* 2014;2014:404680.

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

71. Bouayed J, Bohn T. Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev.* 2010;3(4):228-237.
72. Coentrão P. Avaliação de três técnicas de isolamento de polifenóis: aplicação em amostras de chocolate meio amargo [Dissertação]. Niterói: Universidade Federal Fluminense; 2005.
73. Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics Home.* 1976;24:117-191.
74. Richardson MP. The flavonoids: advances in research. London: Chapman and Hall; 1982.
75. Peterson J, Dwyer J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr Res.* 1998;18(12):1995-2018.
76. Haslam E, Lilley TH, Cai Y, Martin R, Magnolato D. Traditional herbal medicines--the role of polyphenols. *Planta Med.* 1989;55(1):1-8.
77. Saito M, Hosoyama H, Ariga T, Kataoka S, Yamaji N. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. *J Agr Food Chem.* 1998;46(4):1460-1464.
78. Singleton VL. Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods. *Adv Food Nutr Res.* 1981;27:149-242.
79. Leifa F, Pandey A, Soccol CR. Solid state cultivation--an efficient method to use toxic agro-industrial residues. *J Basic Microbiol.* 2000;40(3):187-197.
80. L. G. The consumer market for functional foods. *J Nutraceut Function Med Foods.* 1997;1(3):5-21.
81. Panusa A, Zuorro A, Lavecchia R, Marrosu G, Petrucci R. Recovery of natural antioxidants from spent coffee grounds. *J Agr Food Chem.* 2013;61(17):4162-4168.
82. Moure A, Cruz JM, Franco D, Dominguez JM, Sineiro J, Dominguez H, et al. Natural antioxidants from residual sources. *Food chem.* 2001;72(2):145-171.
83. Reis SF, Rai DK, Abu-Ghannam N. Apple pomace as a potential ingredient for the development of new functional foods. *Int J Food Sci Tech.* 2014;49(7):1743-1750.
84. Chang KC. Polyphenol Antioxidants from Potato Peels: Extraction Optimization and Application to Stabilizing Lipid Oxidation in Foods [Proceedings of The National Conference On Undergraduate Research]. New Brunswick, New Jersey: Rutgers University; 2011.
85. Zhao XY, Chen J, Du FL. Potential use of peanut by-products in food processing: a review. *J Food Sci Tech Mys.* 2012;49(5):521-529.
86. Ma YY, Kerr WL, Cavender GA, Swanson RB, Hargrove JL, Pegg RB. Effect of Peanut Skin Incorporation on the Color, Texture and Total Phenolics Content of Peanut Butters. *J Food Process Eng.* 2013;36(3):316-328.
87. Ramos P, Santos SAO, Guerra AR, Guerreiro O, Felicio L, Jeronimo E, et al. Valorization of olive mill residues: Antioxidant and breast cancer antiproliferative activities of hydroxytyrosol-rich extracts derived from olive oil by-products. *Ind Crop Prod.* 2013;46:359-368.
88. Naveena BM, Sen AR, Vaithyanathan S, Babji Y, Kondaiah N. Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties. *Meat Sci.* 2008;80(4):1304-1308.
89. Vattem DA, Shetty K. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. *Process Biochem.* 2003;39(3):367-379.
90. Ky I, Lorrain B, Kolbas N, Crozier A, Teissedre PL. Wine by-products: phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different French grape varieties. *Mol.* 2013;19(1):482-506.
91. Prior RL, Wu XL, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agr Food Chem.* 2005;53(10):4290-4302.
92. Kaur C, Kapoor HC. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int J Food Sci Tech.* 2002;37(2):153-161.
93. Fogliano V, Verde V, Randazzo G, Ritieni A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J Agr Food Chem.* 1999;47(3):1035-1040.
94. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agr Food Chem.* 2005;53(6):1841-1856.

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

95. Jimenez A, Selga A, Torres JL, Julia L. Reducing activity of polyphenols with stable radicals of the TTM series. Electron transfer versus H-abstraction reactions in flavan-3-ols. *Org Lett.* 2004;6(24):4583-4586.
96. Cao G, Verdon CP, Wu AH, Wang H, Prior RL. Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the COBAS FARA II. *Clin Chem.* 1995;41(12 Pt 1):1738-1744.
97. Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. *J Agr Food Chem.* 2003;51(11):3273-3279.
98. Lussignoli S, Fraccaroli M, Andrioli G, Brocco G, Bellavite P. A microplate-based colorimetric assay of the total peroxy radical trapping capability of human plasma. *Anal Biochem.* 1999;269(1):38-44.
99. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J Agr Food Chem.* 2002;50(16):4437-4444.
100. Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Barclay LR, Locke SJ. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta.* 1987;924(3):408-419.
101. Regoli F, Winston GW. Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxynitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals. *Toxicol Appl Pharm.* 1999;156(2):96-105.
102. Handelman GJ, Cao G, Walter MF, Nightingale ZD, Paul GL, Prior RL, et al. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 1. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and oxygen radical absorbance capacity. *J Agr Food Chem.* 1999;47(12):4888-4893.
103. Neudorffer A, Bonnefont-Rousselot D, Legrand A, Fleury MB, Largeton M. 4-hydroxycinnamic ethyl ester derivatives and related dehydrodimers: Relationship between oxidation potential and protective effects against oxidation of low-density lipoproteins. *J Agr Food Chem.* 2004;52(7):2084-2091.
104. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996;239(1):70-76.
105. Benzie IF, Chung WY, Strain JJ. "Antioxidant" (reducing) efficiency of ascorbate in plasma is not affected by concentration. *J Nutr Biochem.* 1999;10(3):146-150.
106. Benzie IF. An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clin Biochem.* 1996;29(2):111-116.
107. Huang DJ, Ou BX, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agr Food Chem.* 2005;53(6):1841-1856.
108. Tsao R, Yang R, Young JC. Antioxidant isoflavones in Osage orange, *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. *J Agr Food Chem.* 2003;51(22):6445-6451.
109. Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Romandini S, Vidal A, Battino M. Methodological Aspects about Determination of Phenolic Compounds and In Vitro Evaluation of Antioxidant Capacity in the Honey: A Review. *Curr Anal Chem.* 2009;5(4):293-302.
110. Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agr Food Chem.* 2000;48(8):3396-3402.
111. Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J Agr Food Chem.* 2002;50(11):3122-3128.
112. Singleton VL. Citation Classic - Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Agr Biol Environ.* 1985(48):18-18.
113. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Oxidants and Antioxidants*, Pt A. 1999;299:152-178.
114. Callejon RM, Troncoso AM, Morales ML. Determination of amino acids in grape-derived products: a review. *Talanta.* 2010;81(4-5):1143-1152.
115. Peterson GL. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem.* 1979;100(2):201-220.
116. Box JD. Investigation of the Folin-Ciocalteu Phenol Reagent for the Determination of Polyphenolic Substances in Natural-Waters - Reply. *Water Res.* 1984;18(12):1599-1601.

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

117. Magalhaes LM, Segundo MA, Reis S, Lima JL, Rangel AO. Automatic method for the determination of Folin-Ciocalteu reducing capacity in food products. *J Agr Food Chem.* 2006;54(15):5241-5246.
118. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci.* 1993;84(4):407-412.
119. Arnao MB. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci Tech.* 2000;11(11):419-421.
120. Cano A, Acosta M, Arnao MB. A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. *Redox report : communications in free radical research.* 2000;5(6):365-370.
121. Awika JM, Rooney LW, Wu X, Prior RL, Cisneros-Zevallos L. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (sorghum bicolor) and sorghum products. *J Agr Food Chem.* 2003;51(23):6657-6662.
122. Lemanska K, Szymusiak H, Tyrakowska B, Zielinski R, Soffers AEMF, Rietjens IMCM. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(7):869-881.
123. Chan TS, Galati G, Pannala AS, Rice-Evans C, O'Brien PJ. Simultaneous detection of the antioxidant and pro-oxidant activity of dietary polyphenolics in a peroxidase system. *Free Radical Res.* 2003;37(7):787-794.
124. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004;37(4):277-285.
125. Buratti S, Pellegrini N, Brenna OV, Mannino S. Rapid electrochemical method for the evaluation of the antioxidant power of some lipophilic food extracts. *J Agr Food Chem.* 2001;49(11):5136-5141.
126. Ghiselli A, Serafini M, Maiani G, Azzini E, Ferro-Luzzi A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radic Biol Med.* 1995;18(1):29-36.
127. Cao G, Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem.* 1998;44(6 Pt 1):1309-1315.
128. Blois MS. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature.* 1958;181(4617):1199-1200.
129. Brandwilliams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a Free-Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Sci Technol-Leb.* 1995;28(1):25-30.
130. Calliste CA, Trouillas P, Allais DP, Simon A, Duroux JL. Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. *J Agr Food Chem.* 2001;49(7):3321-3327.
131. Nomura T, Kikuchi M, Kubodera A, Kawakami Y. Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Biochem Mol Biol Int.* 1997;42(2):361-370.
132. Shokoufi N, Shemirani F, Assadi Y. Fiber optic-linear array detection spectrophotometry in combination with dispersive liquid-liquid microextraction for simultaneous preconcentration and determination of palladium and cobalt. *Anal Chim Acta.* 2007;597(2):349-356.
133. Dehghani Mohammad Abadi M, Ashraf N, Chamsaz M, Shemirani F. An overview of liquid phase microextraction approaches combined with UV-Vis spectrophotometry. *Talanta.* 2012;99:1-12.
134. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. *Principles of Instrumental Analysis.* 6^o ed. Belmont, CA: Thomson Brooks; 2007.
135. Shokoufi N, Shemirani F, Memarzadeh F. Fiber optic-linear array detection spectrophotometry in combination with cloud point extraction for simultaneous preconcentration and determination of cobalt and nickel. *Anal Chim Acta.* 2007;601(2):204-211.
136. Martin M, Guiochon G. Effects of high pressure in liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2005;1090(1-2):16-38.
137. Wollgast J, Anklam E. Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res Int.* 2000;33(6):423-447.
138. Lee IIS, Widmer BW. Phenolic Compounds. In: NOLLET LML, editor. *Handbook of food analysis.* Basel, New York, Hong Kong: Marcel Dekker Inc.; 1996. p. 821-894.

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

139. Markham KR, Bloor SJ. Analysis and identification of flavonoids in practice. In: Rice-Evans CA, Packer L, editors. *Flavonoids in health and disease*. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker Inc.; 1998. p. 1-33.
140. Mcmurrough I, Byrne JR. HPLC analysis of bittering substances, phenolic compounds and various compounds of alcoholic beverages. In: NOLLET LML, editor. *Food analysis by HPLC*. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker Inc.; 1992. p. 579-641.
141. Okuda T, Yoshida T, Hatano T. New Methods of Analyzing Tannins. *J Nat Prod*. 1989;52(1):1-31.
142. Conder JR. III/Physicochemical Measurements: Gas Chromatography. University of Wales, Swansea, UK: Academic Press; 2000. p. 3808-3815.
143. Peace RW, Gilani GS. Chromatographic determination of amino acids in foods. *J AOAC Int*. 2005;88(3):877-887.
144. Pasquini C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. *J Brazil Chem Soc*. 2003;14(2):198-219.
145. Blanco M, Villarroya I. NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. *Trac-Trend Anal Chem*. 2002;21(4):240-250.
146. Yang H, Irudayaraj J, Paradkar MM. Discriminant analysis of edible oils and fats by FTIR, FT-NIR and FT-Raman spectroscopy. *Food chem*. 2005;93(1):25-32.
147. Rodionova OY, Houmoller LP, Pomerantsev AL, Geladi P, Burger J, Dorofeyev VL, et al. NIR spectrometry for counterfeit drug detection - A feasibility study. *Anal Chim Acta*. 2005;549(1-2):151-158.
148. Lima KMG, Raimundo Jr. IM, Silva AMS, Pimentel MF. Sensores ópticos com detecção no infravermelho próximo e médio. *Quim Nova*. 2009;32:1635-1643.
149. Restaino E, Fassio A, Cozzolino D. Discrimination of meat pates according to the animal species by means of near infrared spectroscopy and chemometrics. *Cyta-J Food*. 2011;9(3):210-213.
150. Pons MN, Le Bonte S, Potier O. Spectral analysis and fingerprinting for biomedica characterisation. *J Biotechnol*. 2004;113(1-3):211-230.
151. Brennan D, Alderman J, Sattler L, O'Connor B, O'Mathuna C. Issues in development of NIR micro spectrometer system for on-line process monitoring of milk product. *Meas*. 2003;33(1):67-74.
152. Ozaki Y. Near-infrared spectroscopy--its versatility in analytical chemistry. *Anal Sci*. 2012;28(6):545-563.
153. Roggo Y, Chalus P, Maurer L, Lema-Martinez C, Edmond A, Jent N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;44(3):683-700.
154. dos Santos CAT, Lopo M, Pascoa RNMJ, Lopes JA. A Review on the Applications of Portable Near-Infrared Spectrometers in the Agro-Food Industry. *Appl Spectrosc*. 2013;67(11):1215-1233.
155. Sjoblom J, Svensson O, Josefson M, Kullberg H, Wold S. An evaluation of orthogonal signal correction applied to calibration transfer of near infrared spectra. *Chemometr Intell Lab*. 1998;44(1-2):229-244.
156. Ebrahimi-Najafabadi H, Leardi R, Oliveri P, Casolino MC, Jalali-Heravi M, Lanteri S. Detection of addition of barley to coffee using near infrared spectroscopy and chemometric techniques. *Talanta*. 2012;99:175-179.
157. Esteban-Diez I, Gonzalez-Saiz JM, Saenz-Gonzalez C, Pizarro C. Coffee varietal differentiation based on near infrared spectroscopy. *Talanta*. 2007;71(1):221-229.
158. Lorenzo C, Garde-Cerdan T, Pedroza MA, Alonso GL, Salinas MR. Determination of fermentative volatile compounds in aged red wines by near infrared spectroscopy. *Food Res Int*. 2009;42(9):1281-1286.
159. Garde-Cerdan T, Lorenzo C, Alonso GL, Salinas MR. Employment of near infrared spectroscopy to determine oak volatile compounds and ethylphenols in aged red wines. *Food chem*. 2010;119(2):823-828.
160. Ferrer-Gallego R, Hernandez-Hierro JM, Rivas-Gonzalo JC, Escribano-Bailon MT. Evaluation of sensory parameters of grapes using near infrared spectroscopy. *J Food Eng*. 2013;118(3):333-339.
161. Martelo-Vidal MJ, Vazquez M. Evaluation of Ultraviolet, Visible, and Near Infrared Spectroscopy for the Analysis of Wine Compounds. *Czech J Food Sci*. 2014;32(1):37-47.

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

162. Shen F, Niu XY, Yang DT, Ying YY, Li BB, Zhu GQ, et al. Determination of Amino Acids in Chinese Rice Wine by Fourier Transform Near-Infrared Spectroscopy. *J Agr Food Chem.* 2010;58(17):9809-9816.
163. Cozzolino D, Cynkar W, Shah N, Smith P. Quantitative analysis of minerals and electric conductivity of red grape homogenates by near infrared reflectance spectroscopy. *Comput Electron Agr.* 2011;77(1):81-85.
164. Gallego AL, Guesalaga AR, Bordeu E, Gonzalez AS. Rapid Measurement of Phenolics Compounds in Red Wine Using Raman Spectroscopy. *T Instrum Meas.* 2011;60(2):507-512.
165. Páscoa RNMJ, Magalhães LM, Lopes JA. FT-NIR spectroscopy as a tool for valorization of spent coffee grounds: Application to assessment of antioxidant properties. Elsevier. 2013
166. Cozzolino D, Kwiatkowski MJ, Parker M, Cynkar WU, Dambergs RG, Gishen M, et al. Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy. *Anal Chim Acta.* 2004;513(1):73-80.
167. Ferrer-Gallego R, Hernandez-Hierro JM, Rivas-Gonzalo JC, Escribano-Bailon MT. Feasibility study on the use of near infrared spectroscopy to determine flavanols in grape seeds. *Talanta.* 2010;82(5):1778-1783.
168. Heikka RA, Immonen KT, Minkkinen PO, Paatero EYO, Salmi TO. Determination of acid value, hydroxyl Value and water content in reactions between dicarboxylic acids and diols using near-infrared spectroscopy and non-linear partial least squares regression. *Anal Chim Acta.* 1997;349(1-3):287-294.
169. Togersen G, Isaksson T, Nilsen BN, Bakker EA, Hildrum KI. On-line NIR analysis of fat, water and protein in industrial scale ground meat batches. *Meat Sci.* 1999;51(1):97-102.
170. Aske N, Kallevik H, Sjoblom J. Determination of saturate, aromatic, resin, and asphaltenic (SARA) components in crude oils by means of infrared and near-infrared spectroscopy. *Energ Fuel.* 2001;15(5):1304-1312.
171. Geladi P, Forsstrom J. Monitoring, of a batch organic synthesis by near-infrared spectroscopy: modeling and interpretation of three-way data. *J Chemom.* 2002;16(7):329-338.
172. Chen D, Hu B, Shao XG, Su QD. Removal of major interference sources in aqueous near-infrared spectroscopy techniques. *Anal Bioanal Chem.* 2004;379(1):143-148.
173. Martelo-Vidal MJ, Dominguez-Agis F, Vazquez M. Ultraviolet/visible/near-infrared spectral analysis and chemometric tools for the discrimination of wines between subzones inside a controlled designation of origin: a case study of Rias Baixas. *Aust J Grape Wine R.* 2013;19(1):62-67.
174. Friedel M, Patz CD, Dietrich H. Comparison of different measurement techniques and variable selection methods for FT-MIR in wine analysis. *Food chem.* 2013;141(4):4200-4207.
175. Buning-Pfaue H. Analysis of water in food by near infrared spectroscopy. *Food chem.* 2003;82(1):107-115.
176. Vaidyanathan S, Arnold SA, Matheson L, Mohan P, McNeil B, Harvey LM. Assessment of near-infrared spectral information for rapid monitoring of bioprocess quality. *Biotechnol Bioeng.* 2001;74(5):376-388.
177. de Sena MM, Poppi RJ, Frighetto RTS, Valarini PJ. Evaluation of the use of chemometric methods in soil analysis. *Quim Nova.* 2000;23(4):547-556.
178. Rinnan A, van den Berg F, Engelsen SB. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *Trac-Trend Anal Chem.* 2009;28(10):1201-1222.
179. Vandeginste BGM. Chemometrics - General Introduction and Historical Development. *Top Curr Chem.* 1987;141:1-42.
180. Bruns RE, Faigle JFG. Quimiometria. *Quim Nova.* 1985:15.
181. Oliveira FCC, de Souza ATPC, Dias JA, Dias SCL, Rubim JC. The choice of the spectral region in the use of spectroscopic and chemometric methods. *Quim Nova.* 2004;27(2):218-225.
182. Mendham J, Denney RC, Barnes JD, Thomas MJK. *Análise química quantitativa.* 6ª edition ed. Rio de Janeiro 2002. p. 488.
183. Souza AM, Poppi RJ. Teaching Experiment of Chemometrics for Exploratory Analysis of Edible Vegetable Oils by Mid Infrared Spectroscopy and Principal Component Analysis: A Tutorial. Part I. *Quim Nova.* 2012;35(1):223-229.
184. A. HF, Rakocevic M, Fontoura L, Guiotoku M, Magalhães WLE. Perspective of using near infrared spectroscopy (nir) in taste analysis of mate chimarrão in solid state. 4º Congresso Sul-Americano de Yerba-Mate; Argentina 2014.

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

185. Naes T, Isaksson T, Fearn T, Davies T. A User Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification. Chichester: NIR Publications; 2002.
186. Roggo Y, Chalus P, Maurer L, Lema-Martinez C, Edmond A, Jent N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;44(3):683-700.
187. Martens H, Naes T. Multivariate Calibration. Chichester: John Wiley & Sons; 1989. 438 p.
188. Bakeev KA. Process Analytical Technology. Oxford: Blackwell Publishing; 2005. 451 p.
189. Beebe KR, Pell RJ, Seasholtz MB. Chemometrics: A Practical Guide. New York: Wiley; 1998.
190. Otto M. Chemometrics Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry. Germany; 1999.
191. de Lira LFB, de Albuquerque MS, Pacheco JGA, Fonseca TM, Cavalcanti EHD, Stragevitch L, et al. Infrared spectroscopy and multivariate calibration to monitor stability quality parameters of biodiesel. *Microchem J.* 2010;96(1):126-131.
192. Pontes MJC, Cortez J, Galvao RKH, Pasquini C, Araujo MCU, Coelho RM, et al. Classification of Brazilian soils by using LIBS and variable selection in the wavelet domain. *Anal Chim Acta.* 2009;642(1-2):12-18.
193. Vieira RAM. Monitoramento e Controle em Linha de Reação de Polimerização em Emulsão. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2000.
194. Cerqueira EO, Poppi RJ, Kubota LT, Mello C. Utilization of Fourier transform filter for noise minimization in analytical signals. *Quim Nova.* 2000;23(5):690-698.
195. Lyra WdS, Silva ECd, Araújo MCud, Fragoso WD, Veras G. Classificação periódica: um exemplo didático para ensinar análise de componentes principais. *Quim Nova.* 2010;33:1594-1597.
196. Serra CSR. Controle de reações de polimerização em miniemulsão através de técnicas de espectroscopia NIR e RAMAN. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2013.
197. Souza AM, Coelho MR, Figueiras P, Cunha TAF, Dart RO, Parés JG, et al. Proposta de tutorial de quimiometria utilizando técnicas modernas para a análise de solos. VI Simpósio Brasileiro de Educação em Solos; Sobral, Brasil 2012.
198. Almeida FMN. Espectroscopia de Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier (FT-NIR) na Caracterização de Farinhas para Alimentação Pueril. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa; 2009.
199. Sjöblom J, Svensson O, Josefson M, Kullberg H, Wold S. An evaluation of orthogonal signal correction applied to calibration transfer of near infrared spectra. *Chemometr Intell Lab.* 1998(44):15.
200. Rambo MKD. Caracterização de resíduos lignocelulósicos por espectroscopia NIR aliada à quimiometria para a obtenção de insumos químicos. São Paulo: Universidade Estadual de Campinas; 2013.
201. Westerhuis JA, de Jong S, Smilde AK. Direct orthogonal signal correction. *Chemometr Intell Lab.* 2001;56(1):13-25.
202. Colmán MME. Monitoramento da Polimerização de Acrilamida em Miniemulsão Inversa por Espectroscopia RAMAN e NIR. Santa Catarina, Brasil: Universidade Federal de Santa Catarina; 2013.
203. SIMÕES SS. Desenvolvimento de métodos validados para a determinação de captopril usando espectrometria NIR e calibração multivariada. Brasil: Universidade Federal da Paraíba; 2008.
204. Ferreira MMC, Antunes AM, Melgo MS, Volpe PLO. Chemometrics I: Multivariate calibration, a tutorial. *Quim Nova.* 1999;22(5):724-731.
205. Wold S, Esbensen K, Geladi P. Principal Component Analysis. *Chemometr Intell Lab.* 1987;2(1-3):37-52.
206. Geladi P, Kowalski BR. Partial Least-Squares Regression - a Tutorial. *Anal Chim Acta.* 1986;185:1-17.
207. Hair JF, Anderson RE, Tatham RL. Análise Multivariada de Dados. 5ª edition ed. Porto Alegre: Bookman; 2005.
208. Ribeiro FAL. Aplicação de métodos de análise multivariada no estudo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. São Paulo: Universidade Estadual de Campinas; 2001.
209. Ferrão MF, Mello C, Borin A, Maretto DA, Poppi RJ. LS-SVM: uma nova ferramenta quimiométrica para regressão multivariada. Comparação de modelos de regressão LS-SVM e PLS na quantificação de adulterantes em leite em pó empregando NIR. *Quim Nova.* 2007;30:852-859.

QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS EM RESÍDUOS VITIVÍNICOLAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO

210. Grung B, Kvalheim OM. Rank determination of spectroscopic profiles by means of cross validation. The effect of replicate measurements on the effective degrees of freedom. *Chemometr Intell Lab.* 1994;22:115-125.
211. Souza AM, Breikreitz MC, Filgueiras PR, Rohwedder JJR, Poppi RJ. Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. *Quim Nova.* 2013;36:1057-1065.
212. Thomas EV. A Primer on Multivariate Calibration. *Anal Chem.* 1994;66(15):A795-A804.
213. Kramer R. *Chemometric Techniques for Quantitative Analysis.* 1^a edition ed. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1998. 203 p.
214. Parreira TF. *Utilização de métodos quimiométricos em dados de natureza multivariada.* Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2003.
215. Cornell JA. *The Original Mixture Problem: Designs and Models for Exploring the Entire Simplex Factor Space. Experiments with Mixtures:* John Wiley & Sons, Inc.; 2002. p. 22-95.
216. Lafka T-I, Sinanoglou V, Lazos ES. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food chem.* 2007;104(3):1206-1214.
217. Sant'Anna V, Brandelli A, Marczak LDF, Tessaro IC. Kinetic modeling of total polyphenol extraction from grape marc and characterization of the extracts. *Sep Purif Technol.* 2012;100(0):82-87.
218. Magalhaes LM, Barreiros L, Maia MA, Reis S, Segundo MA. Rapid assessment of endpoint antioxidant capacity of red wines through microchemical methods using a kinetic matching approach. *Talanta.* 2012;97:473-483.
219. Burns DA, Ciurczak EW. *Handbook of near-infrared analysis.* 3^o edition ed. Boca Raton: CRC Press; 2008.
220. Naes T, Isaksson T, Fearn T, Davies T. *A User Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification.* Chichester: NIR Publications; 2004.
221. Ziemons E, Mantanus J, Lebrun P, Rozet E, Evrard B, Hubert P. Acetaminophen determination in low-dose pharmaceutical syrup by NIR spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;53(3):510-516.
222. Parreira TF, Ferreira MMC, Sales HJS, de Almeida WB. Quantitative determination of epoxidized soybean oil using near-infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Appl Spectrosc.* 2002;56(12):1607-1614.
223. De Girolamo A, Lippolis V, Nordkvist E, Visconti A. Rapid and non-invasive analysis of deoxynivalenol in durum and common wheat by Fourier-Transform Near Infrared (FT-NIR) spectroscopy. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2009;26(6):907-917.
224. Rockenbach II, Rodrigues E, Gonzaga LV, Caliari V, Genovese MI, Goncalves AEDS, et al. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food chem.* 2011;127(1):174-179.
225. Rockenbach II, Gonzaga LV, Rizelio VM, Goncalves AEDS, Genovese MI, Fett R. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. *Food Res Int.* 2011;44(4):897-901.
226. Makris DP, Boskou G, Andrikopoulos NK. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *J Food Compos Anal.* 2007;20(2):125-132.
227. Sarraguca MC, Santos JR, Rangel AOSS, Lopes JA. Authenticity Control of Roasted Coffee Brands Using Near-Infrared Spectroscopy. *Food Anal Method.* 2013;6(3):892-899.
228. Pascoa RNMJ, Magalhaes LM, Lopes JA. FT-NIR spectroscopy as a tool for valorization of spent coffee grounds: Application to assessment of antioxidant properties. *Food Res Int.* 2013;51(2):579-586.
229. Bokobza L. Near infrared spectroscopy. *Journal of near Infrared Spectroscopy*, Vol 6 1998. 1998:3-17.
230. Soukupova J, Rock BN, Albrechtova J. Spectral characteristics of lignin and soluble phenolics in the near infrared - a comparative study. *Int J Remote Sens.* 2002;23(15):3039-3055.
231. Torchio F, Segade SR, Giacosa S, Gerbi V, Rolle L. Effect of Growing Zone and Vintage on the Prediction of Extractable Flavanols in Winegrape Seeds by a FT-NIR Method. *J Agr Food Chem.* 2013;61(38):9076-9088.