



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



TELMA MARIA GUEDES DA SILVA

**TINTA ANTI-INCRUSTANTE E ANÁLISES DE RESÍDUOS DA
INDÚSTRIA VINÍCOLA (*Vitis sp.*) DO VALE DO SÃO FRANCISCO**

RECIFE

2016

TELMA MARIA GUEDES DA SILVA

**TINTA ANTI-INCRUSTANTE E ANÁLISES DE RESÍDUOS DA
INDÚSTRIA VINÍCOLA (*Vitis sp.*) DO VALE DO SÃO FRANCISCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

ORIENTADORA: DRA. TANIA MARIA SARMENTO DA SILVA

RECIFE

2016

Catálogo na fonte
Bibliotecário Jefferson Luiz Alves Nazareno CRB 4-1758

S586t Silva, Telma Maria Guedes da.
Tinta anti-incrustante e análises de resíduos da indústria vinícola (Vitis SP) do Vale do São Francisco / Telma Maria Guedes da Silva. – 2016.
192f.: fig., tab.

Orientadora: Tania Maria Sarmento da Silva.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN.
Química Fundamental. Recife, 2016.
Inclui referências.

1. Química orgânica . 2. Produtos naturais . 3. Anti-incrustantes
I. Silva, Tania Maria Sarmento da (Orientadora). II. Título.

547 CDD (22. ed.) UFPE-FQ 2016-59

TELMA MARIA GUEDES DA SILVA

**TINTA ANTI-INCRUSTANTE E ANÁLISES DE RESÍDUOS DA
INDÚSTRIA VINÍCOLA (*VITIS SP*) DO VALE DO SÃO FRANCISCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

Aprovado em: 11/08/2016.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tania Maria Sarmiento da Silva (Orientadora)

Departamento de Química
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Eduardo de Jesus Oliveira

Departamento de Farmácia
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Profa. Marcia Silva do Nascimento

Departamento de Antibióticos
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Kristerson Reinaldo de Luna Freire

Departamento de Biotecnologia-CBIOTEC
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Celso de Amorim Camara

Departamento de Química
Universidade Federal Rural de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. **Tania Maria Sarmiento da Silva** pela oportunidade, confiança, incentivo e contribuição em minha formação acadêmica.

Aos Professores Dra. **Patrícia Lopes Barros de Araújo** (Departamento de Engenharia Biomédica – UFPE), Dr. **Elmo Silvano de Araújo** (Departamento de Energia Nuclear – UFPE) e Dra. **Kátia Aparecida da Silva Aquino** (Colégio de Aplicação da UFPE), pela grande colaboração na elaboração e produção das Tintas.

Ao **Aldair José Sarmiento da Silva** e **Maria José Sarmiento Filha**, pela ajuda na coleta dos dados do teste de imersão.

À **Júlia Campos** (CETENE), pela contribuição nas aquisições dos espectros de MALDI-TOF.

A todos os amigos do Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica (LaBioFito), em especial a **Silvana Alves, Paulo Ricardo, Girliane Regina e Natália Ramos**, pelo apoio incondicional em todos os momentos, pela amizade, carinho e contribuição de todos.

À **Universidade Federal de Pernambuco** e ao **Programa de Pós-Graduação em Química da UFPE**, pela oportunidade.

À **Banca Examinadora**, por aceitar o convite.

Ao meu marido **Rodrigo Meira**, pelo apoio, carinho, paciência, dedicação e grande ajuda nessa caminhada.

Ao meu grande amigo e irmão **Marcílio Martins**, pelo apoio nessa jornada.

Ao **CENAPESP** pelo apoio estrutural, em especial a **Patrícia**, pela disponibilidade sempre que precisei.

A **CAPES** pela bolsa de estudo concedida.

“...E aprendi que se depende sempre
De tanta, muita, diferente gente
Toda pessoa sempre é as marcas
Das lições diárias de outras tantas pessoas.
E é tão bonito quando a gente entende
Que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá...”
Gonzaguinha

RESUMO

O Vale do São Francisco está localizado em uma região entre os estados de Pernambuco e Bahia. Responsável por 99% da uva de mesa exportada e pela produção de cerca de 6 milhões de litros de vinhos finos por ano. No processo de vinificação, os compostos fenólicos são extraídos da uva e o álcool produzido na fermentação ajuda neste processo. Os bagaços da uva gerados são descartados e devido o teor de fenólicos contido nos resíduos o presente trabalho teve como objetivo propor o desenvolvimento de uma tinta ambientalmente amigável e eficiente que poderá ser utilizada como anti-incrustantes em estruturas parciais ou totalmente submersas no mar. Para a caracterização química dos resíduos de duas variedades de uva (*Vitis sp.*) foram utilizadas técnicas cromatográficas e espectrométricas para identificação estrutural dos constituintes. O teor de fenólicos encontrados nos bagaços da uva Moscato foram de $423,81 \pm 1,72$ mg EAG/g de extrato, $104,49 \pm 2,90$ mgEAG/g de extrato para a semente e casca, respectivamente e de $133,92 \pm 1,99$ mgEAG/g de extrato de bagaço da Shiraz. Nos testes qualitativos de teor de flavonoides, taninos condensados, galotaninos e antocianinas, os taninos foram encontrados em maiores concentrações nos extratos da casca Moscato acetona 70%, semente Moscato etanol e extrato do bagaço Shiraz etanol 80%. Nos extratos do cultivar Shiraz foram identificadas, por MALDI-TOF e UPLC-DAD-qTOF-MS, 54 antocianinas e foram isolados os principais constituintes: 2 flavonoides glicosilados (isoquercetina e isoramnetina-3-O- β -D-glicosídeo) e 4 antocianinas em mistura (malvidina-3-O-glicosídeo, peonidina-3-O-glicosídeo, malvidina-3-O-(6-O-*p*-cumaroil)-glicosídeo e peonidina-3-O-(6-O-*p*-cumaroil)-glicosídeo). Da semente da uva Moscato foram identificadas 24 proantocianidinas com grau de polimerização variando de 1-6 unidades de (epi)catequina e (epi)galocatequina. Na casca da uva Moscato foram identificadas 6 proantocianidinas dentre elas dois trímeros de (epi)afzelequina, 4 oligômeros de (epi)catequina e (epi)afzelequina. Nos testes de toxicidade com *Artemia salina* os três extratos não apresentaram toxicidade e os complexos cobre-resíduos apresentaram alta toxicidade. Os testes de imersão com as placas contendo as tintas anti-incrustantes obtidas dos resíduos demonstram que apresentaram eficiência superior à tinta contendo complexo obtido de tanino comercial, durante o mesmo tempo de imersão. Os extratos da semente da uva Moscato e o bagaço da uva Shiraz apresentaram o melhor resultado no teste de imersão. Com base nos resultados obtidos, verificou-se que o pigmento do complexo resíduo-cobre, produzido à base dos extratos, é uma atraente alternativa para utilização em formulações anti-incrustantes. Além disso, representa o aproveitamento e agregação de valor aos resíduos vinícolas da Região do Vale do São Francisco.

Palavras chave: Resíduos. Uva. Moscato. Shiraz. Antocianinas. Proantocianinas. Anti-incrustantes.

ABSTRACT

Vale do São Francisco is located in a region between the states of Pernambuco and Bahia-BR. Responsible for 99% of the exported grapes and the production of about 6 million liters of fine wine per year. In the winemaking process, the phenolic compounds are extracted from the grape and the alcohol produced during fermentation help in this process. The grape marc generated are discarded and because the content of phenolic contained in the waste the present study aimed to the development of an environmentally friendly and efficient ink that can be used as anti-fouling in the partial structures or completely submerged in the sea. For chemical characterization of waste from the two varieties of grape (*Vitis sp.*) were performed chromatographic and spectrometric techniques to identify structural constituents. The phenolic content found in the Moscato grape marc were 423.81 ± 1.72 mgGAE/g of extract, 104.49 ± 2.90 mgEAG/g of extract for seed and peel, respectively, and 133.92 ± 1.99 mgEAG/g of extract of the marc of Shiraz variety. In the qualitative analysis of flavonoid content, condensed tannins, gallotannins and anthocyanins, tannins were found in higher concentrations in the extracts of the skin Moscato acetone 70%, seed Moscato ethanol and waste extract Shiraz ethanol 80%. In the extracts of cultivar Shiraz were identified by MALDI-TOF and UPLC-DAD-qTOF-MS, 54 anthocyanins and isolated the mainly constituents: 2 glycosides flavonoids (Isoquercetin and isorhamnetin-3-O- β -D-glucoside) and 4 anthocyanins mixture (malvidin-3-O-glucoside, peonidin-3-O-glucoside, malvidin-3-O-(6-O-*p*-coumaroyl)-glucoside and peonidin-3-O-(6-O-*p*-coumaroyl)-glucoside). Twenty four proanthocyanidins were identified in the seed of Moscato grape, with degree of polymerization ranging from 1-6 units of (epi)catechin and (epi)galocatechin. In the peel of Moscato grape were identified 6 proanthocyanidins among them two trimers of (epi)afzelechin, 4 oligomers of (epi)catechin and (epi)afzelechin. In toxicity tests with Brine shrimp the three extracts showed low toxicity. On the other hand, the waste copper-complexes showed a high toxicity in the tests. The immersion tests with plates containing antifouling paints obtained from waste, demonstrate that the coatings containing the residue of grape-copper complex exhibited superior efficiency to the ink containing the complex obtained from commercial tannins. The extracts of the seed of Moscato grape and Shiraz grape marc showed the best result in the immersion test. Based on these results, it was found that the pigment-copper complex of the residue produced on the basis of the extracts are an attractive alternative for use in antifouling formulations, because these formulations have a lower copper concentration than conventional antifouling paints. In addition, it features the use and adding value to waste wineries in the Vale do São Francisco.

Keywords: Waste. Grape. Moscato. Shiraz. Anthocyanins. Proanthocyanidins. Antifouling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do fruto de <i>Vitis</i> sp. Fonte: http://diariodovinho.com./	25
Figura 2. Mapa da Vitivinicultura no Brasil. Fonte Embrapa/Ubravin.....	26
Figura 3. Mapa vinícola do Vale do São Francisco. Fonte: academiadovinho.com.br	28
Figura 4. Cacho de uva Shiraz. Fonte: Guerra et al., 2009.	30
Figura 5. Cacho de uva Moscato Canelli. Fonte: Guerra et al., 2009.	31
Figura 6. Principais antocianinas das uvas <i>Vitis vinifera</i>	33
Figura 7. Estruturas da (+)-catequina, (-)-epicatequina e dímeros tipo A e B de flavan-3-ol.....	34
Figura 8. Principais estilbenos identificados em uvas.	35
Figura 9. Principais flavonóis encontrados em uvas.....	36
Figura 10. Resíduo de vinificação da Vinícola Ouro Verde - BA.	39
Figura 11. Formação de incrustações em superfície em contato com o mar. Fonte: http://pt.dreamstime.com	40
Figura 12. Biocidas homologados pela Organização Marítima Internacional (IMO) para utilização em tintas anti-incrustantes.	43
Figura 13. Representação de Ionização por MALDI.....	46
Figura 14. Vinicola Ouro Verde e resíduos coletados para análise.	49
Figura 15. Reação do ácido gálico com o molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.	51
Figura 16. Esquema ilustrado da complexação do flavonóide quercetina com cloreto de alumínio ($AlCl_3$) o qual forma o complexo estável flavonóide- Al^{3+} (WOISKY; SALATINO, 1998).	53
Figura 17. Formas estruturais de antocianinas em diferentes valores de pH. Fonte: Giusti e Wrolstad, 2001.	54
Figura 18. Ilustração da síntese do complexo resíduo uva-cobre.	61
Figura 19. Placas com as tintas e local do teste de imersão.	65
Figura 20. Espectro de MALDI-TOF-MS do extrato hidroalcoólico do bagaço da uva Shiraz (A) e expansão de 700 a 1300 Da (B).....	72
Figura 21. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon m/z 449 - cianidina-3-O- β -D-glicosídeo.	76

Figura 22. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon <i>m/z</i> 463 - peonidina-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glicosídeo.	77
Figura 23. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon <i>m/z</i> 465 - delphinidina-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glicosídeo.	77
Figura 24. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon <i>m/z</i> 479 - petunidina-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glicosídeo.	78
Figura 25. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon <i>m/z</i> 493 - malvidina-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glicosídeo.	78
Figura 26. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon <i>m/z</i> 535 - malvidina-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acetil)-glicosídeo.	79
Figura 27. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon <i>m/z</i> 505 e 507 - peonidina-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acetil)-glicosídeo, delphinidina-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acetil)-glicosídeo, respectivamente.	80
Figura 28. Estruturas das antocianinas-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroil)-glicosídeo identificadas por massas (MALDI-TOF).	81
Figura 29. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon <i>m/z</i> 595 - cianidina-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroil)-glicosídeo.	81
Figura 30. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon <i>m/z</i> 609 - peonidina-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroil)-glicosídeo.	82
Figura 31. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon <i>m/z</i> 639 - malvidina-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroil)-glicosídeo.	82
Figura 32. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon <i>m/z</i> 611 - delphinidina-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroil)-glicosídeo.	83
Figura 33. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon <i>m/z</i> 625 - petunidina-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroil)-glicosídeo.	83
Figura 34. Estruturas das antocianinas-3,5- <i>O</i> - β - <i>D</i> -diglicosídeo identificadas por MALDI-MS e MS/MS, no extrato hidroalcoólico do bagaço da uva Shiraz.	84
Figura 35. Estruturas das piranoantocianinas identificadas por MALDI-MS e MS/MS, no extrato hidroalcoólico do bagaço da uva Shiraz.	85
Figura 36. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon <i>m/z</i> 573, que correspondem a carboxi-piranopeonidina-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acetil)-glicosídeo.	85
Figura 37. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) dos íons <i>m/z</i> 487/489, 517 e 531, que correspondem a piranopeonidina-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glicosídeo, piranodelphinidina-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glicosídeo, respectivamente.	85

glicosídeo, piranomalvidina-3-O- β -D-glicosídeo e carboxi-piranopeonidina-3-O- β -D-glicosídeo, respectivamente.....	86
Figura 38. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) dos íons m/z 647, 677 e 707, que correspondem a metil-piranopeonidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaroil)-glicosídeo, metil-piranomalvidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaroil)-glicosídeo e carboxi-piranomalvidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaroil)-glicosídeo, respectivamente.....	87
Figura 39. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon m/z 693 que corresponde a carboxi-piranopetunidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaroil)-glicosídeo [$M^+ - 308$] e carboxi-piranopeonidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cafeoil)-glicosídeo [$M^+ - 324$].....	87
Figura 40. Mecanismo de Formação da Vitisina A. Fonte: DE FREITAS; MATEUS, 2011; FEI et al., 2012.	89
Figura 41. Estruturas das flavanil-piranoantocianinas identificadas por espectro de massas (MALDI-MS e MS/MS).	90
Figura 42. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon m/z 805, 847 e 951.	91
Figura 43. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon m/z 775 e 921.	91
Figura 44. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon m/z 809, 925 e 955. A perda de 290 Da corresponde a (epi) catequina.	92
Figura 45. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon m/z 1093 e 1239. A perda de 290 Da corresponde a (epi) catequina.	92
Figura 46. Cromatograma obtido por CLAE-DAD em 340 nm (A), 520 nm (B) espectros de UV de SH-1.....	94
Figura 47. Espectro de massas (ESI-MS) de SH-1 (A). MS/MS 493 - malvidina-3-O- β -D-glicosídeo (B) e MS/MS 463 - peonidina-3-O- β -D-glicosídeo (C).....	95
Figura 48. Espectro de APT de SH-1 em DMSO- d_6 (125 MHz).	96
Figura 49. Cromatograma obtido por CLAE-DAD (320 nm) e espectro de UV de SH-2.1.	99
Figura 50. Espectro de APT de SH-2.1 em DMSO- d_6 (125 MHz)	99
Figura 51. Espectro de RMN de 1H de SH-2.1 em DMSO- d_6 (500 MHz).....	100
Figura 52. Espectro de massas (ESI ⁺ -MS) de SH-2.1	101
Figura 53. Cromatograma obtido por CLAE-DAD em 320 nm e espectro de UV de SH-2.2	103
Figura 54. Espectro de RMN de 1H de SH-2.2 em DMSO- d_6 (300 MHz).....	104
Figura 55. Espectro de APT de SH-2.2 em DMSO- d_6 (125 MHz)	104

Figura 56. Espectro de massas (ESI ⁺ -MS) de SH-2.2.....	105
Figura 57. Cromatograma obtido por CLAE-DAD em 520 nm e espectro de UV de SH-2.3	108
Figura 58. Espectro de RMN de ¹ H de SH-2.3 em Metanol- <i>d</i> ₄ (300 MHz).....	108
Figura 59. Espectro de APT de SH-2.3 em Metanol- <i>d</i> ₄ (125 MHz)	109
Figura 60. Espectro de massas (MALDI-MS) de SH-2.3	109
Figura 61. Estrutura das antocianinas identificadas em SH-2.3.	110
Figura 62. Espectro de massas (MALDI-TOF) do extrato etanólico das sementes Moscato. A) Faixa de íons com <i>m/z</i> de 300-1800 Da. B) Faixa de íons com <i>m/z</i> de 920-1770 Da.....	114
Figura 63. Proantocianidinas identificadas por MALDI-TOF do extrato etanólico da semente da uva Moscato.	116
Figura 64. Cromatograma de UPLC-MS em modo TIC do extrato etanólico das sementes da uva Moscato.....	117
Figura 65 Espectro de ESI-MS do extrato etanólico semente Moscato em modo negativo e positivo.....	118
Figura 66. Espectro de MALDI-TOF-MS do extrato hidroacetônico da casca da uva Moscato (A) e expansão de 800 a 1810 Da (B).	119
Figura 67. Proantocianidinas identificadas por MALDI-TOF do extrato acetona 70% da casca da uva Moscato.....	120
Figura 68. Cromatograma de UPLC-MS em modo TIC do extrato acetona 70% das cascas da uva Moscato	121
Figura 69. Espectro de ESI-MS do extrato acetona 70% da casca Moscato em modo negativo e positivo.....	122
Figura 70. Espectros de Infravermelho do extrato acetona 70% da casca da uva Moscato (A1) e do complexo extrato casca moscato-cobre (A2).....	124
Figura 71. Espectros de Infravermelho do extrato etanólico da semente uva Moscato (B1) e do complexo extrato semente Moscato-cobre (B2).....	125
Figura 72. Espectros de Infravermelho do extrato etanol 80% bagaço uva Shiraz (C1) e do complexo bagaço uva Shiraz-cobre (C2).	126
Figura 73. Espectro de MALDI-TOF-MS dos extratos Moscato casca acetona 70%, Moscato semente etanol e Shiraz bagaço etanol 80%, respectivamente.	127

Figura 74. Espectro de MALDI-TOF-MS dos complexos Cu-Moscato casca acetona 70%, Cu-Moscato semente etanol e Cu-Shiraz bagaço etanol 80%, respectivamente.	128
Figura 75. Teor de Cu liberado para a água do mar, tempo de análise 24, 48 e 72h.	131
Figura 76. Comportamento anti-incrustante nos testes de imersão do Branco, Controle positivo e tintas contendo complexo de resíduo uva-cobre após 1 semana de imersão.....	132
Figura 77. Comportamento anti-incrustante nos testes de imersão do Branco, Controle positivo e tintas contendo complexo de resíduo uva-cobre após 4 semanas de imersão.....	133
Figura 78. Aumento da massa de incrustação em placas imersas no teste de imersão em profundidades de 50 cm e 100 cm.....	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimentos dos extratos obtidos das sementes e cascas da uva Moscato e bagaço de Shiraz.	66
Tabela 2. Teor de Fenólicos Totais dos extratos da semente e casca da uva Moscato e do bagaço da Shiraz, em mg EAG/g de extrato.....	67
Tabela 3. Teores de flavonoides, antocianinas, taninos condensados e galotaninos	69
Tabela 4. Proposta de identificação das substâncias presentes no extrato etanol/água (8:2) do bagaço da uva Shiraz. Análise por MALDI-TOF.....	73
Tabela 5. Dados de RMN de APT (125,0 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de SH-1 (malvidina-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glicosídeo e peonidina-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glicosídeo). Deslocamentos químicos (δ) em ppm.	97
Tabela 6. Dados de RMN de ¹ H e APT (500,0 e 125,0 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de SH-2.1 (Isoquercetina). Deslocamentos químicos (δ) em ppm.	102
Tabela 7. Dados de RMN de ¹ H e APT (500,0 e 125,0 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , respectivamente) de SH-2.2 (isoramnetina-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glicosídeo). Deslocamentos químicos (δ) em ppm.....	106
Tabela 8. Dados de RMN de APT (125,0 MHz, Metanol- <i>d</i> ₄) de SH-2.3 (malvidina-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroil)-glicosídeo e peonidina-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroil)-glicosídeo. Deslocamentos químicos (δ) em ppm.	111
Tabela 9. Proantocianidinas identificadas no extrato da semente de uva Moscato. Cálculos de massa foram feitas com base na equação $288a + 304b + 152c + 2 + 23$, onde <i>a</i> é o número de unidades procianidina, <i>b</i> é o número de unidades prodelfinidina, e <i>c</i> é o número de grupos galoil, 2 corresponde ao número de hidrogênio adicional nas subunidades terminais e 23 é a massa atômica de sódio.	115
Tabela 10. Proantocianidinas identificadas no extrato da casca de uva Moscato. Cálculos de massa foram feitas com base na equação $288a + 272b + 152c + 2 + 23$, onde <i>a</i> é o número de unidades (epi)catequina, <i>b</i> é o número de unidades (epi)afzelequina, e <i>c</i> é o número de grupos galoil, 2 corresponde ao número de hidrogênio adicional nas subunidades terminais e 23 é a massa atômica de sódio.	120

Tabela 11. Rendimento dos complexos extrato-cobre.....	123
Tabela 12. Toxicidade dos extratos e complexos frente teste com <i>Artemia salina</i> no tempo de 24h	129

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Obtenção dos extratos bagaço uva Moscato.	50
Esquema 2. Obtenção do extrato do bagaço da uva Shiraz.....	50
Esquema 3. Isolamento das principais antocianinas presentes no bagaço da uva Shiraz	59

LISTA DE ABREVIACOES

CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ctv	Cultivar
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DAD	Detector com Arranjo de Diodos
EAG	Equivalente de cido Gálico
EAM	Equivalente de Antocianinas Monoméricas
EAT	Equivalente de cido Tnico
EC	Equivalente de Catequina
EQ	Equivalente de Quercetina
Glc	Glicose
IV	Infravermelho
m	Mutipleto
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrognio-1
RMN de ¹³ C	Ressonância Megntica Nuclear de Carbono-13
s	Simpleto
TC	Tanato de Cobre
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

OBS: As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritos no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
2.1. Vitivinicultura no Brasil.....	24
2.1.1 Região do Vale do São Francisco	28
2.2. Uvas em estudo.....	29
2.2.1 Shiraz.....	29
2.2.2. Moscato Canelli.....	30
2.3. Principais fenólicos da uva	31
2.4. Subproduto da vinificação	37
2.5. Bioincrustações e tintas anti-incrustantes.....	39
2.5.1. Bioincrustações.....	39
2.5.2. Tintas anti-incrustantes	41
2.5.3. Cobre como biocida	44
2.6. Técnica de ionização e dessorção a laser assistida por matriz-MALDI-TOF45	
3. OBJETIVOS	48
3.1. Objetivo Geral.....	48
3.2. Objetivos Específicos	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1. Coleta do Material Vegetal	49
4.2. Obtenção dos extratos brutos.....	49
4.3. Análise do teor de fenólicos, flavonoides, antocianinas e taninos dos resíduos das uvas Moscato e Shiraz	51
4.3.1. Teor de fenólicos totais	51
4.3.2. Teor de flavonoides.....	52

4.3.3. Quantificação das antocianinas monoméricas	53
4.3.4. Teor de taninos condensados	55
4.3.5. Teor de taninos hidrolisáveis (galotaninos)	56
4.3.6. Tratamento estatístico	56
4.4. Análises dos extratos obtidos dos resíduos das uvas Moscato e Shiraz por massas de alta resolução (MALDI-TOF).....	57
4.5. Isolamento e identificação das principais antocianinas presentes no resíduo da uva Shiraz coletada na região do Vale do São Francisco.....	57
4.6. Síntese e caracterização do complexo do resíduo uva-cobre	60
4.7. Avaliação da toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	61
4.8. Determinação do teor de cobre (Cu) dos complexos resíduos de uva-cobre por absorção atômica	62
4.9. Preparação da tinta anti-incrustante	63
4.10. Preparação das placas e avaliação do poder anti-incrustante em ambiente marinho (teste de imersão)	64
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1. Rendimentos e seleção dos extratos brutos.....	66
5.2. Teor de flavonoides, antocianinas e taninos.....	69
5.3. Caracterização química do extrato etanol/água (8:2) do bagaço da uva Shiraz por MALDI-TOF-MS e MS/MS.....	72
5.4. Isolamento e identificação das principais antocianinas presentes no resíduo da uva Shiraz coletada na região do Vale do São Francisco.....	93
5.5. Caracterização química do extrato etanólico da semente da uva Moscato por MALDI-TOF-MS e ESI-TOF-MS.	112
5.6. Caracterização química do extrato acetona/água (7:3) da casca da uva Moscato por MALDI-TOF-MS e ESI-TOF-MS.....	118
5.7. Síntese e caracterização por espectroscopia de infra-vermelho e MALDI-TOF do complexo resíduo uva-cobre.	122

5.8. Ensaio de toxicidade dos extratos das uvas e complexos resíduo uva-cobre frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i>	128
5.9. Análise do teor de cobre por espectroscopia de absorção atômica.....	130
5.10. Avaliação do poder anti-incrustante em ambiente marinho (teste de imersão).....	131
6. CONCLUSÕES	137
7. REFERÊNCIAS	138
8. ANEXO	169

1. INTRODUÇÃO

A uva é o fruto da videira (*Vitis sp*) proveniente da família Vitaceae, obtida de várias espécies vegetais, dentre elas destacam-se *Vitis vinifera* destinada à produção de vinhos finos. Todas se apresentam sob a forma de cachos e estes se dividem em engaço (3-9 %) e bago (91-97 %) (SANTOS, 2004). Com exceção da polpa, todas as demais partes da uva são consideradas resíduos da vinicultura, são exemplos de resíduos do processo de vinificação o bagaço, que é formado pela película (membrana externa) e grainha (semente), o engaço, que são os pedúnculos onde estão sustentados os bagos, e também a borra, que são resíduos sólidos depositados nos recipientes após os processos fermentativos (SILVA, 2003; TOUNSI, 2009).

No Brasil, mais de uma dezena de regiões produzem vinhos finos e/ou vinhos de consumo corrente. Os vinhos finos são aqueles elaborados exclusivamente a partir de uvas de variedades européias (*Vitis vinifera* L.). Atualmente, a vitivinicultura brasileira de vinhos finos é desenvolvida como atividade economicamente importante nas regiões geográficas Sul e Nordeste. Nas regiões sul-brasileiras colhe-se uma safra por ano, como na clássica viticultura mundial. Já no Nordeste, as colheitas se sucedem ao longo do ano. As diferentes regiões, com distintas características de clima, solo, variedades de uvas, sistemas de produção e de vinificação e envelhecimento possibilitam a produção de vinhos com ampla diversidade de características de sabor e aroma peculiares, o que constitui uma das qualidades da vitivinicultura brasileira atual (GUERRA et al., 2009). O Rio Grande do Sul está em destaque para produção do vinho. Em segundo lugar, é ocupado pelo promissor Vale do Rio São Francisco, situado na fronteira de Pernambuco e Bahia no Nordeste brasileiro, que vem despertando a curiosidade do mundo com seus bons vinhos (GUERRA et al., 2009).

O Brasil é uma das maiores potências agrícolas do mundo e como consequência é um dos países que mais produz resíduos agroindustriais por isso tem buscado cada vez mais alternativas para melhorar este quadro. O valor estimado de descarte da indústria de vinho é superior a 13% e todo este produto contribui para a poluição ambiental mesmo se tratando de um produto

biodegradável, pois o mesmo necessita de um tempo para sua mineralização (CATANEO, et al., 2008).

A preocupação com o meio ambiente motivou trabalhos de aproveitamento deste tipo de resíduo e com relação à vinicultura sua relevância é maior, pois neste tipo de indústria só uma pequena parte dos resíduos são reaproveitados sob a forma de adubo e grande parte é jogada fora como lixo industrial ou queimada. Pesquisas relacionadas ao aproveitamento de resíduos do vinho ainda são temas inovadores mesmo na Europa onde a vinicultura tem características milenares (FAMUYIWA, OUGH, 1982; ROCKENBACH et al., 2011b; 2012; MAKRIS et al., 2007).

O bagaço de uva é uma fonte importante e barata de polifenóis. Os principais polifenóis são principalmente as antocianinas, flavonóis, flavanois, ácidos fenólicos e resveratrol. Vários estudos relataram atividade antioxidante dos extratos de bagaço de uva, sugerindo que os subprodutos vinícolas podem ser utilizados para a produção de antioxidantes naturais (BOUSSETTA et al, 2011; ROCKENBACH, et al., 2011a; ROCKENBACH et al., 2011b; 2012).

Tintas e revestimentos são produtos comerciais de largo uso em todo o mundo e movimentam mais de 5 bilhões de dólares ao ano só nos EUA. A grande variedade de formulações disponíveis no mercado atende às mais diversas necessidades de aplicações e custos. Entretanto, durante esta primeira década do século XXI, exigências ambientais têm condicionado novos padrões para formulações de tintas e revestimentos, tanto no Brasil quanto no resto do mundo. (ARMSTRONG et al., 2000; BURGESS et al., 2003). Levando-se em conta a importância do setor dos transportes marítimos e o comércio internacional, perdas econômicas causadas por incrustações, de acordo com projeções para 2020, poderá originar uma perda 150 bilhões de dólares por ano em todo o mundo (HELIO et al., 2009; BELLOTTI et al., 2012).

Dentre os diversos grupos de contaminantes orgânicos potencialmente danosos a ecossistemas aquáticos, despontaram nos últimos anos os biocidas utilizados como princípio ativo de tintas anti-incrustantes. Essas tintas são aplicadas como sistemas de proteção, com a finalidade de combater a formação e o estabelecimento de comunidades bioincrustantes (*biofouling*) sobre superfícies expostas à água. Usualmente, tintas anti-incrustantes são aplicadas em embarcações comerciais e de passeio, plataformas petrolíferas, tubulações

submarinas, comportas de represas, tanques destinados à aquicultura, dentre outras estruturas (YEBRA et al., 2004; CASTRO et al., 2011).

Em virtude da constante pressão internacional sobre a utilização de tintas anti-incrustantes, a indústria naval tem frequentemente buscado alternativas ambientalmente amigáveis. Entre essas iniciativas destacam-se o desenvolvimento de tintas anti-incrustantes à base de produtos naturais e os revestimentos livres de biocidas (CASTRO et al., 2011).

Na busca de alternativas menos poluentes, várias classes de compostos naturais vêm sendo testadas em formulações anti-incrustantes, dentre estas estão os taninos. Os taninos (proantocianidinas) são oligômeros de flavan-3-ol com massa molecular variando de 578 a >5000 Da (PRIEUR et al., 1994; LABARBE et al., 1999; SUN et al., 1998). A ação anti-incrustante de taninos é conhecida desde os anos 50 (KNOWLES & WHITE, 1958) e há relatos de estudos com substâncias pertencentes a esta classe de produtos naturais, extraídas de diferentes espécies de plantas (NOOR IDORA et al., 2015). Tintas anti-incrustantes à base de taninos podem ser uma alternativa eficaz às tintas anti-incrustantes comerciais. Um dos inconvenientes dos taninos é a solubilidade em água, que acelera a lixiviação deste aditivo da superfície pintada para o meio. Uma solução é a complexação de taninos com pequenas proporções de íons Cu^{2+} resultando em complexos de tanato de cobre de baixa solubilidade em água e associam as atividades anti-incrustantes do tanino e do cobre em um único aditivo, que pode ser incorporado a tintas da mesma forma que outros aditivos insolúveis comuns, como os pigmentos (ANDRADE et al., 2010).

O aditivo tem aplicação na indústria de tintas, com aplicação direta na indústria naval para proteção de cascos contra proliferação de micro-organismos, além de agregar valor comercial aos resíduos das uvas com um impacto na economia local e geração de novos empregos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Vitivinicultura no Brasil

As uvas (*Vitis* sp., Vitaceae) estão entre as frutas mais nutritivas consumidas, sendo aproveitadas, principalmente, a polpa e semente (GUERRA et al., 2009). Possuem importância na alimentação devido às características terapêuticas e nutricionais, provenientes de ácidos orgânicos, compostos fenólicos, vitaminas e minerais presentes em sua polpa (LEÃO et al., 2009).

A família Vitaceae compreende 800 espécies divididas em 12 gêneros, com distribuição tropical e subtropical. A maior parte dos membros da família são espécies trepadeiras, dotadas de gavinhas (brotos ou inflorescências modificadas, que podem ter ventosas na extremidade). Há também algumas espécies de arbustos eretos cujos nós são frequentemente articulados ou dilatados. Vários gêneros são ornamentais, como *Cissus*, *Parthenocissus* e *Vitis*. (SOUZA, LORENZI, 2012).

O gênero *Vitis* é o principal representante da família com milhares de variedades de uva. A maioria pertence à espécie *Vitis vinifera*, originária no Cáucaso (região localizada entre a Europa e a Ásia) e difundida por toda a costa mediterrânea há centenas de anos, seja para a produção de fruta para consumo “*in natura*” ou como matéria-prima para a elaboração de vinhos (GUERRA et al. 2009). A espécie foi cultivada por várias civilizações europeias durante milhares de anos, o que originou dezenas de variedades denominadas castas (YANG et al., 2009).

A videira é uma planta trepadeira com tronco retorcido, ramos flexíveis, folhas grandes e repartidas, flores esverdeadas e frutos carnosos, denominados uvas ou bagas e aglomerados em cachos (GIOVANNINI, 1999) (Figura 1). Os frutos de *Vitis* sp. se apresentam na forma de cachos que se dividem em engaço (3-9 %) e bago (91-97 %), sendo o bago dividido em casca (10-15 %), polpa (80-85 %) e semente (3-5 %) (SANTOS, 2004).



Figura 1. Representação do fruto de *Vitis* sp. Fonte: [http://diariodovinho.com./](http://diariodovinho.com/)

A videira foi trazida pelos portugueses ao Brasil e seu cultivo começou em 1530 na Capitania de São Vicente, atuais estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. No entanto, o impulso ao cultivo foi dado com a imigração italiana em São Paulo e no Rio Grande do Sul no final do século XIX (MELLO, 2002). Em função da diversidade climática encontrada no Brasil, a viticultura se espalhou pelo país e muitas regiões produzem vinhos finos e/ou vinhos de consumo corrente (PROTAS et al., 2006).

A vitivinicultura, apesar de ser uma atividade econômica recente no Brasil, quando comparada aos países tradicionalmente produtores da Europa, é uma atividade já consolidada com importância socioeconômica, principalmente nas regiões Sul e Nordeste (Figura 2). Na região sul do país colhe-se uma safra por ano, como na clássica viticultura mundial. Já no Nordeste as colheitas se sucedem ao longo do ano. As diferentes regiões, com distintas características de clima, solo, variedades de uvas, sistemas de produção, de vinificação e envelhecimento possibilitam a produção de vinhos com ampla diversidade de sabor e aroma, o que constitui uma das qualidades da vitivinicultura brasileira (GUERRA et al., 2009).

Novas fronteiras da vitivinicultura

Áreas de cultivo de uvas, fabricação de suco e preparo de vinhos



Figura 2. Mapa da Vitivinicultura no Brasil. Fonte Embrapa/Ubravin.

Existem inúmeras variedades de uvas para a elaboração de vinhos em diferentes regiões vinícolas no Brasil, sendo duas categorias principais: *Vitis vinifera*, denominada uva fina, que gera vinhos superiores e encorpados e *Vitis labrusca*, que dá vinhos comuns devido à sua rusticidade e resistência. Aproximadamente 70 cultivares compõem o elenco brasileiro de uvas finas para processamento. As principais cultivares tintas, pelo volume processado, são Cabernet Sauvignon, Merlot, Cabernet Franc, Tannat, Ancellota, Pinot Noir e Egiodola, mais expressivas no sul do país, e as cultivares Shiraz (Syrah) e Alicante Bouschet, mais importantes na Região Nordeste. No caso de uvas finas brancas para processamento, mais de 50 cultivares estão difundidas nos vinhedos do Brasil, destacando-se, no Sul, as cvs Moscato Branco, Riesling Itálico, Chardonnay, Prosecco, Trebbiano, e Moscato Giallo, e, na região Nordeste, as cvs. Chenin Blanc, Moscato Canelli e Itália, esta última também utilizada como uva de mesa (CAMARGO, 2015).

Em 2015, ocorreu aumento de 4,41% na produção nacional de uvas, comparando com 2014. A produção anual de uva é estimada em quase 1.500.000

toneladas, em uma área cultivada de aproximadamente 79 mil hectares, o Brasil ocupa a décima quinta posição na produção mundial de uva de mesa, sendo a Itália e a China os dois maiores produtores. Em 2015, as exportações brasileiras do setor vitivinícola foram de 81,81 milhões de dólares, 8,32% inferior das realizadas no ano de 2014 (MELLO, 2015).

Na Região Sul, maior produtora do país, a produção destina-se principalmente a indústria vinícola, nas demais regiões predomina-se a produção de uva de mesa (*in natura*). No Rio Grande do Sul, em 2015, a produção de vinhos, sucos e derivados foi de 583.015 milhões de litros, 15,38% superior à verificada em 2014 (MELLO, 2015). No Nordeste brasileiro, a partir de meados dos anos 80, com a introdução de uvas destinadas a indústria vinícola, a vitivinicultura passou a se destacar como uma alternativa econômica para a agricultura irrigada nos estados de Pernambuco e da Bahia, mais precisamente no polo Petrolina (PE) – Juazeiro (BA), localizado no Vale do Rio São Francisco. Na década de 90, os viticultores da região já se preocupavam em diversificar a produção de uvas, o que resultou na importação e introdução de cultivares de uvas sem sementes, adequadas ao mercado nacional e internacional (GRANGEIRO et al., 2002).

A vitivinicultura brasileira possui grande importância social e econômica pelo elevado impacto na geração de emprego e renda, tanto nos segmentos de uvas de mesa, concentrada especialmente no nordeste brasileiro, quanto nas uvas para processamento, destinada à elaboração de vinhos finos, vinhos de mesa, espumantes, suco de uva, além de destilados e vinagres. Pode-se afirmar que a cadeia vitivinícola brasileira se caracteriza por ser um mosaico composto de diversos segmentos, cada um com suas peculiaridades, regiões de maior expressão e, sobretudo, graus diferenciados de competitividade. Além disso, uma das características mais marcantes dos diferentes segmentos da vitivinicultura é a coexistência de regiões com diferenças climáticas, que vão desde regiões temperadas de altitude até polos de produção em clima tropical (ZANUS, 2015).

2.1.1. Região do Vale do São Francisco

O polo vitivinícola do Vale do São Francisco (Figura 3) reúne sete vinícolas entre o Sertão de Pernambuco e o Norte da Bahia. Essa área, em plena Caatinga, tornou-se a segunda maior produtora de vinhos, espumantes e sucos naturais de uva no Brasil. Situado entre Pernambuco e Bahia, em uma latitude até então impensável para o mundo do vinho (9º) o Vale do São Francisco caminha para ser um dos importantes produtores vitivinícolas do país, e vem despertando a curiosidade mundial. O polo ocupa uma área de mais de 10 mil hectares entre os municípios pernambucanos de Lagoa Grande (a capital da uva e do vinho do Nordeste) e Santa Maria da Boa Vista (que sedia a vinícola pioneira no negócio a Fazenda Milano que depois veio a se consagrar com a marca Botticelli), além de Casa Nova (cidade baiana que incrementou o enoturismo na região, com a vinícola Ouro Verde do grupo Miolo) (CODEVASF, 2014).

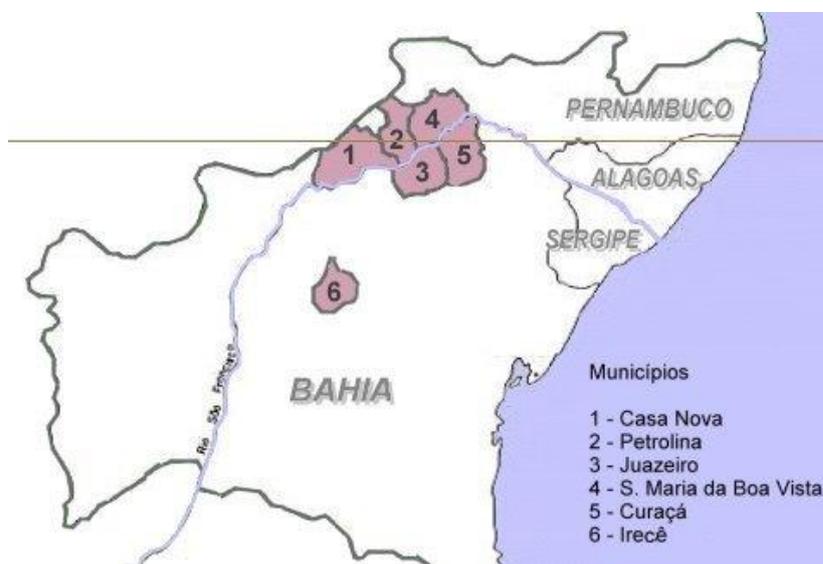


Figura 3. Mapa vinícola do Vale do São Francisco. Fonte: academiadovinho.com.br

Responsável por 99% da uva de mesa exportada pelo Brasil e pela produção de 6 milhões de litros de vinhos finos por ano é a única região do mundo que produz duas safras e meia por ano. A viticultura pernambucana/baiana já detém 15% do

mercado nacional e emprega diretamente 30 mil pessoas no Vale do São Francisco. As principais variedades cultivadas são Shiraz (Syrah), Cabernet Sauvignon, variedades tintas, Moscatel, Muscadel, Chardonnay, Sauvignon Blanc, Silvaner, Moscato Canelli, variedades brancas, além da uva Itália utilizada, principalmente, como uva de mesa (CODEVASF, 2014; CAMARGO, 2015). No ano de 2015 foram produzidas, no Vale de São Francisco, 314,768 toneladas de uvas o que representa quase 30% de toda uva produzida no país em 2015, ficando atrás apenas do Rio Grande do Sul, responsável por mais de 58% da produção (MELLO, 2015).

2.2. Uvas em estudo

2.2.1 Shiraz

A uva Shiraz (em inglês) ou Syrah (em francês) (Figura 4) é uma casta de uva tinta da família da *Vitis vinifera*, muito utilizada na produção de vinhos, é uma uva de superior qualidade, originalmente proveniente do Cáucaso, é talvez a uva vinífera mais antiga do mundo. Típica de climas quentes teve excelente adaptação na Austrália onde é considerada a uva símbolo. Já conquistou espaço na Califórnia, África do Sul, Chile, Argentina e Brasil. Chegou ao Rio Grande do Sul em 1921, procedente dos vinhedos Vila Cordélia, de São Paulo. Até 1970, não logrou espaço nos vinhedos comerciais do Estado. Desde então, acompanhando a história de outras viníferas finas francesas, começou a ser plantada comercialmente em Santana do Livramento e na Serra Gaúcha, a partir de mudas importadas por vinícolas destas regiões. É uma casta muito sensível a podridões do cacho, o que a torna de difícil cultivo nas condições ambientais da Serra Gaúcha. Todavia, nas condições semiáridas do Nordeste, tem mostrado ótimo desempenho na região do Vale do São Francisco. Seus aromas recordam ameixa, figo e especiarias, como pimenta do reino preta. O vinho de Shiraz é característico pelo seu aroma e buquê (CAMARGO, 2015; GUERRA et al., 2009).

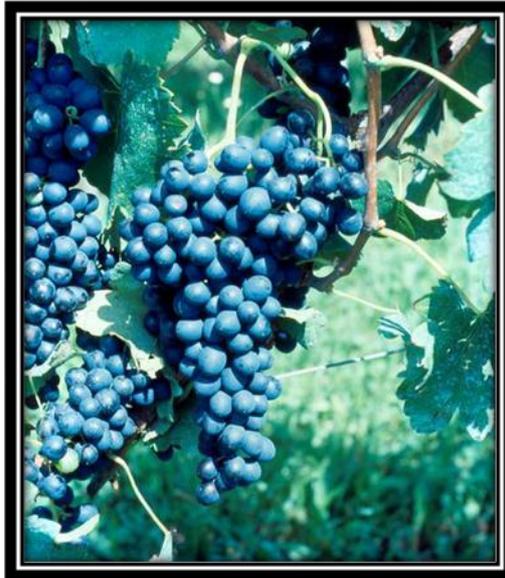


Figura 4. Cacho de uva Shiraz. Fonte: Guerra et al., 2009.

2.2.2. Moscato Canelli

A Moscato Canelli variedade de uva procedente da Itália foi introduzida no Vale do São Francisco no início da década de 1980, quando lá se iniciou o cultivo de uvas para vinho. Apresentou ótima adaptação às condições do semiárido nordestino, sendo a principal uva branca cultivada atualmente naquela região. O nome moscato significa "preferido das abelhas", por conta do grande teor de açúcar que a *Vitis vinifera* acumula quando madura. Outra característica importante é que são uvas que, quando vinificadas, podem produzir desde vinhos secos, aromáticos e frutados, passando por espumantes e chegando aos de sobremesa, muitos deles naturalmente doces. Nenhuma outra casta tem tanta versatilidade. No Brasil, a principal produção de vinhos com a uva Moscatel é a de espumantes que possuem teor alcoólico um pouco mais baixo, doçura e perfume acentuados, e por isso, é um vinho que conquista muitos paladares (GUERRA et al., 2009).

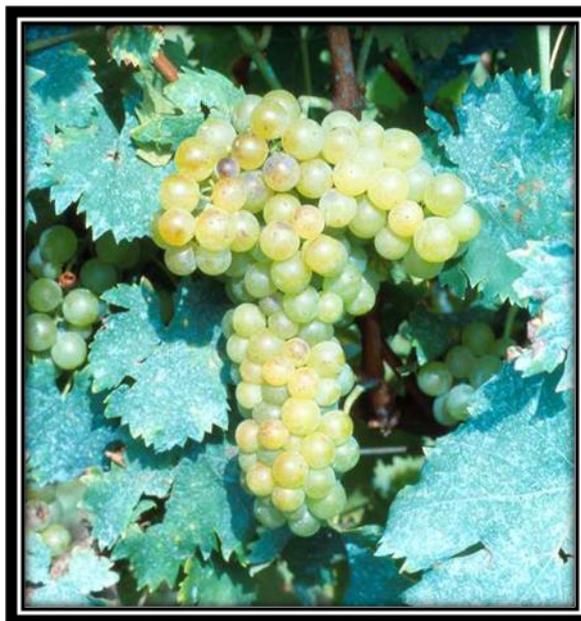


Figura 5. Cacho de uva Moscato Canelli. Fonte: Guerra et al., 2009.

2.3. Principais fenólicos da uva

Os polifenóis são um grupo de compostos químicos encontrados em plantas e caracterizados pela presença de um ou mais anéis fenólicos. Frutos e vegetais são as principais fontes de compostos fenólicos na dieta humana, onde grandes concentrações de polifenóis são encontradas nas bagas, no chá, na cerveja, no vinho, no azeite, no chocolate/cacau, no café, nas nozes, nos amendoins, nas romãs, no milho, entre outros (LANDETE, 2012).

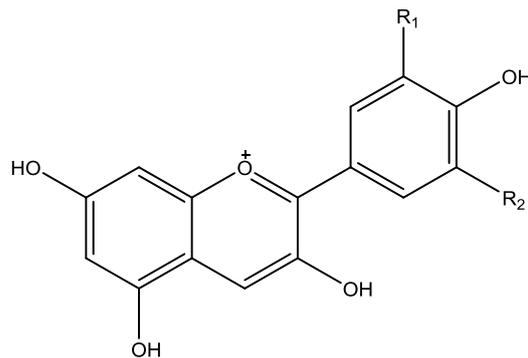
Eles têm sido considerados como importantes compostos antioxidantes devido à sua atividade como captadores de radicais livres, quelação de metais, indução de antioxidantes endógenos (glutathione peroxidase, glutathione reductase, superóxido dismutase, lipoxigenases, entre outras) e modelação de enzimas agindo contra o estresse oxidativo. Recentemente têm sido também reconhecidos como modeladores de sinais celulares e inflamação, através da interação direta com receptores ou enzimas envolvidas na transdução de sinais, modelação de genes relacionados com a sobrevivência/morte celular, regulação da função mitocondrial,

vias de síntese de lipídeos e proteínas, agem no combate às doenças inflamatórias e alérgicas, doenças cardiovasculares, diabetes e doenças neurodegenerativas (RAHMAN et al., 2006; FRAGA et al. 2010; LARANJINHA, 2010; QUIDEAU et al., 2011; RODRIGO et al., 2011; SINGH et al., 2011).

Os benéficos à saúde atribuída ao consumo de vinho são provenientes dos principais metabólitos encontrados na uva. O estudo epidemiológico Francês, realizado no final da década de 1970 relata que, na França, apesar do elevado consumo de alimentos ricos em gorduras saturadas a incidência da mortalidade por doenças cardiovasculares era menor do que em outros países com dietas comparáveis. Este fenômeno foi então chamado de "o paradoxo francês" e estava relacionado com o alto consumo do vinho tinto (RENAUD; DE LORGERIL, 1992).

Dentre as espécies vegetais que produzem compostos fenólicos, a videira (*Vitis spp.*) destaca-se em função dos altos teores destes metabólitos presentes nas cascas dos frutos, folhas e sementes. As uvas de variedades tintas caracterizam-se por apresentar teores elevados de compostos fenólicos, quando comparados às variedades brancas e rosadas. Os fenólicos desempenham um papel importante em enologia, pois contribuem para atributos sensoriais como adstringência, sabor e cor (ANDRADE et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2003; WANG; HUANG, 2004). Dentre os diversos polifenóis encontrados nas uvas, encontram-se as antocianinas, os taninos e os estilbenos.

As antocianinas são os compostos responsáveis pela cor vermelha de uvas e de vinhos. São antioxidantes e corantes naturais das uvas e são bastante utilizadas nas indústrias farmacêuticas, nutracêuticas e de alimentos (CAMIRE et al., 2002). As principais antocianinas das uvas *Vitis vinifera* são: delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina e a malvidina (Figura 6), presente nas cascas geralmente na forma 3-O-glicosídeo, 3-acetil-3-O-glicosídeo, 3-O-(6-O-*p*-cumaroil)-glicosídeo, 3-O-(6-O-cafeoil)-glicosídeo, 3,5-O-diglicosídeo, 3-acetil-5-O-diglicosídeo, 3-cumaroil-5-O-diglucosídeo, e 3-cafeoil-5-O-diglicosídeo (WANG et al., 2003).



Cianidina– $R_1 = H$; $R_2 = OH$

Delfinidina – $R_1 = OH$; $R_2 = OH$

Peonidina – $R_1 = OCH_3$; $R_2 = H$

Petunidina – $R_1 = OCH_3$; $R_2 = OH$

Malvidina– $R_1 = OCH_3$; $R_2 = OCH_3$

Figura 6. Principais antocianinas das uvas *Vitis vinifera*.

Durante o envelhecimento do vinho, as antocianinas reagem com outros compostos, presentes no próprio vinho ou nos barris de armazenagem, formando novos compostos com diferentes características cromáticas. Já foram identificadas em vinhos tintos mais de 100 pigmentos derivados de antocianinas (VERSARI et al., 2008; BOIDO et al., 2006; ALCALDE-EON et al., 2006).

As flavan-3-óis são as principais classes de polifenóis de uva, que incluem (+)-catequina e (-)-epicatequina e seus oligômeros chamados procianidinas, proantocianidinas e prodelfinidinas. Procianidinas e proantocianidinas (taninos condensados) podem ser do tipo A e do tipo B, encontrados principalmente nas cascas e sementes da uva. Já as prodelfinidinas são taninos poliméricos compostos por unidades de galocatequina, encontrados principalmente nas sementes (FLAMINI, 2013).

Durante a vinificação, os taninos condensados (ou não hidrolisáveis) são transferidos para o vinho e contribui fortemente para a característica sensorial do produto. Na boca, a formação de complexos entre os taninos e proteínas da saliva confere ao vinho a característica sensorial de adstringência (amargor). A adstringência do vinho está ligada à estrutura dos taninos, em especial a quantidade

de grupos galoil e grau de polimerização de flavan-3-ols (CHEYNIER; RIGAUD, 1986; VIDAL et al., 2003).

Taninos da uva são usados como ingredientes ativos em medicamentos caracterizados por atividade antioxidante de plasma e para o tratamento de distúrbios circulatórios como: fragilidade capilar, microangiopatia da retina, redutores da agregação plaquetária, diminuição da susceptibilidade das células saudáveis em relação aos agentes tóxicos e cancerígenos, e atividade antioxidante para a lipoproteína humana de baixa densidade (FLAMINI, 2003).

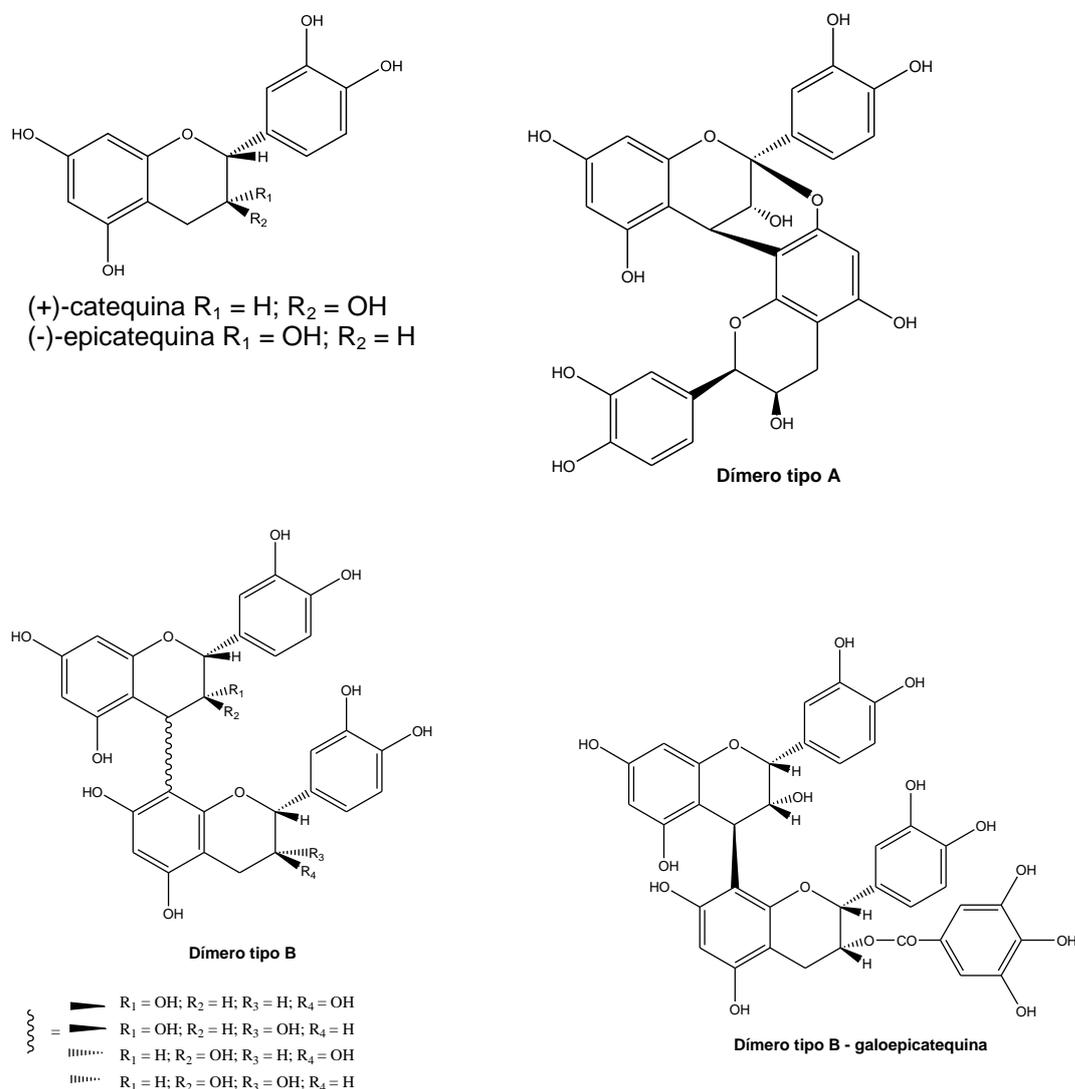


Figura 7. Estruturas da (+)-catequina, (-)-epicatequina e dímeros tipo A e B de flavan-3-ol.

Compostos de estilbeno são as principais fitoalexinas de uva e são representados, principalmente, pelo *cis* e *trans*-resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e seus derivados glicosilados (*cis* e *trans* piceide), piceatanol (3,4,3',5'- tetra-hidroxi-*trans*-estilbeno) e os oligômeros de estilbeno (viniferinas) (Figura 8). Vários estudos têm evidenciado que o *trans*-resveratrol apresenta atividades anticancer, cardioprotetora, anti-inflamatória, antioxidante e inibição de agregação de plaquetas (JANG et al., 1997; HUNG et al., 2000; FRANKEL et al., 1993; FRÉMONT et al., 1999; BERTELLI, et al., 1995; PACE-ACSIK et al. 1995; BAVARESCO et al., 2012). As viniferinas podem surgir a partir da oligomerização de *trans*-resveratrol nos tecidos da videira como ação de defesa da planta contra ataques exógenos (CICHEWICZ et al., 2000; SBAGHI, et al., 1996).

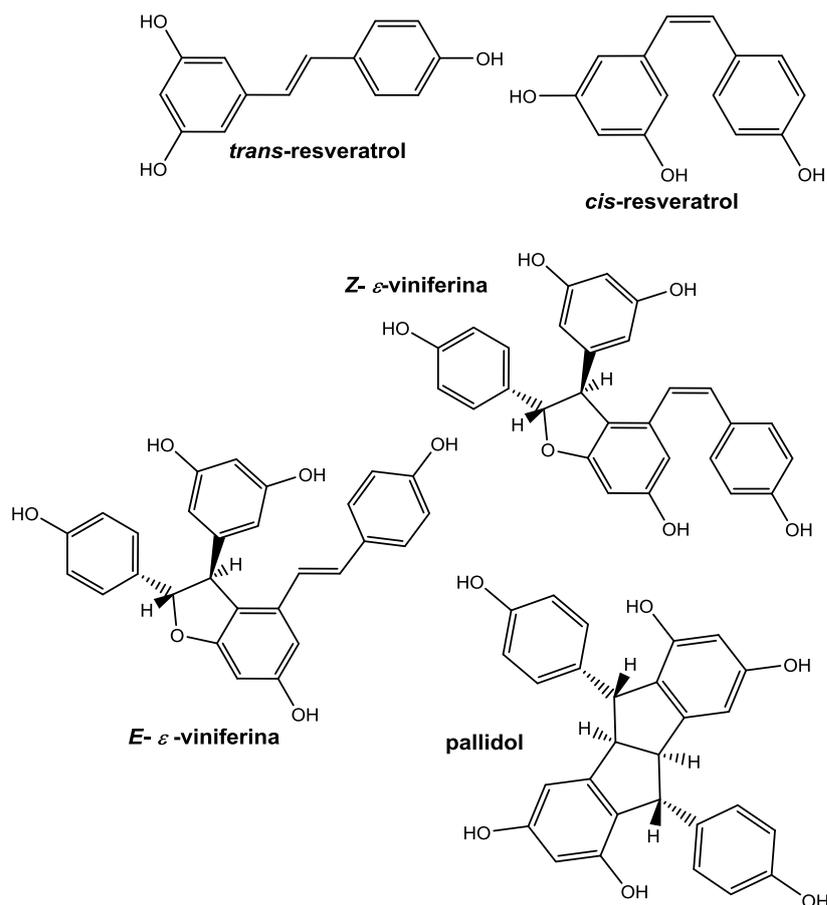


Figura 8. Principais estilbenos identificados em uvas.

Outra importante classe de polifenóis encontrados nas uvas são os flavonóis. Estes compostos estão principalmente presentes na casca da uva, os mais comumente encontrados são a quercetina, o canferol e a miricetina (Figura 9). Esses flavonóis são geralmente encontrados na forma de glicosídeos como, por exemplo, a isoquercetina. Também foram identificados em uva flavonóis metoxilados como: isoramnetina, laricitrina e siringetina (Figura 9) (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2007; CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009).

A síntese de flavonóis ocorre nas cascas, praticamente durante todo o crescimento da baga, e seu conteúdo varia conforme a resposta a condições restritivas ou de estresse (DELOIRE et al., 1998). Embora seja uma família minoritária nas uvas, os flavonóis têm um papel importante na evolução da cor dos vinhos tintos através de processos de co-pigmentação com as antocianinas (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

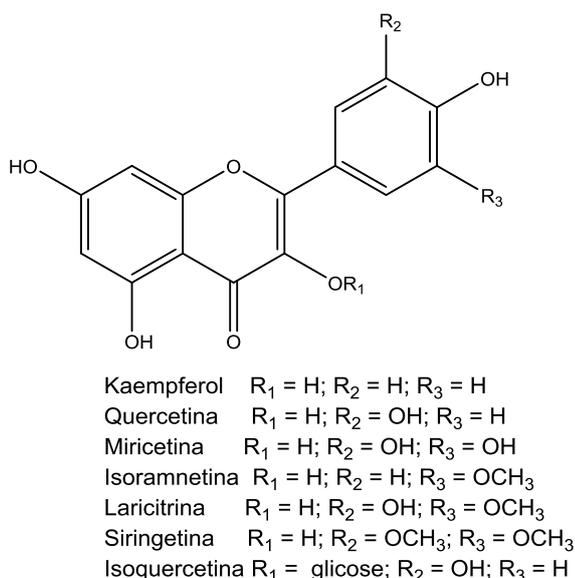


Figura 9. Principais flavonóis encontrados em uvas.

Os ácidos fenólicos (hidroxicinâmico e benzoico) representam a terceira classe de compostos fenólicos mais abundantes nas bagas das uvas (KENNEDY et al., 2006). Encontram-se nos vacúolos das células das películas e polpas, geralmente sob a forma de ésteres tartáricos (CONDE et al., 2007; ADAMS, 2006). Estes compostos possuem um papel importante nas oxidações que conduzem ao

acastanhamento dos mostos e dos vinhos. Embora não exerçam influência direta no gosto dos vinhos, os voláteis derivados dos ácidos fenólicos estão envolvidos nos aromas primários que são desenvolvidos durante a maturação (GARCIA et al., 2003).

Os ácidos orgânicos também estão presentes nas uvas, em quantidades consideráveis, e é considerado um fator chave que determina se o mosto tem potencial de produzir um bom e estável vinho (CONDE et al., 2007). Os ácidos tartárico e málico representam de 68 a 92% dos ácidos presentes nos frutos e folhas das videiras. O ácido tartárico é específico da uva, e a videira é uma das raras plantas que o sintetiza em quantidade elevada, possibilitando sua extração comercial (RIZZON; SGANZERLA, 2007).

2.4. Subproduto da vinificação

Os produtores e indústrias da área vitivinícola enfrentam, como consequência da expressiva atividade agroindustrial brasileira, o problema de descarte da biomassa residual, que, embora biodegradável, necessita de um tempo mínimo para ser mineralizada, constituindo-se numa fonte de poluentes ambientais. Dessa forma existe atualmente um interesse crescente na exploração dos resíduos gerados pela indústria do vinho, que na maioria das vezes são descartados ou subaproveitados (ARVANITTOYANNIS et al., 2006).

Com exceção da polpa todas as demais partes da uva são consideradas resíduos da viticultura. São exemplos de resíduos do processo de vinificação o bagaço que é formado pela casca (membrana externa) e grainha (semente), o engaço que são os pedúnculos onde estão sustentados os bagos e também a borra que são resíduos sólidos depositados nos recipientes após os processos fermentativos (SILVA, 2003; TOUNSI, 2009).

Em relação à viticultura, a indústria de vinho branco projeta que de cada 100 litros de vinho produzido geram-se 31,7 Kg de resíduos e dentre estes 20 kg são de bagaço, já o vinho tinto produz 25 kg de resíduos (CAMPOS, 2005). O valor estimado de descarte da indústria de vinho é superior a 13% e todo este produto

contribui para a poluição ambiental (CATANEO, 2008). No Brasil, a maior parte do bagaço de uva gerado na produção de vinhos, próximo de 59,4 milhões de quilos, considerando 18 kg de bagaço/ 100 litros de vinho, é tratado como resíduo com baixo valor, sendo utilizado, por exemplo, para a ração animal. Os resíduos da industrialização da uva, quando bem trabalhados podem se tornar matérias-primas para outras atividades, como por exemplo a compostagem para uso agrícola ou similar (ROKENBACH et al. 2011).

A cada ano, o processamento de uvas para a produção de vinhos e sucos mundialmente, gera uma quantidade estimada de 10 milhões de toneladas de resíduos (MAIER et al., 2009). Sementes e cascas de uvas são onde a maior parte dos compostos fenólicos se acumula. Por essa razão, o extrato obtido do bagaço da uva tem se tornado popular recentemente para a obtenção de ingredientes funcionais, tais como antioxidantes naturais e suplementos alimentares (BAGCHI et al., 2000; SHRIKHANDE, 2000; XU et al. 2010).

As sementes constituem uma proporção considerável do bagaço da uva, no valor de 38-52% com base na matéria seca (GHAFOOR et al., 2009). A composição de sementes de uva é basicamente de 40% de fibra, 16% de óleo, 11% de proteína, 7% de compostos fenólicos complexos como taninos (CAMPOS et al., 2008). Nas sementes da uva, as procianidinas representam em geral a maior parte dos polifenóis. Esses fenólicos despertam muito interesse devido a seus efeitos benéficos para a saúde humana (SHRIKHANDE, 2000; TORRES; BOBET, 2001; BOUSSETTA et al., 2011; ROCKENBACH et al., 2011a). No processo de vinificação parte dos compostos fenólicos são extraídos da uva e o álcool produzido na fermentação ajuda neste processo (CATANEO et al., 2008). A Figura 10 apresenta os resíduos de vinificação coletados na Vinícola Ouro Verde – BA.



Figura 10. Resíduo de vinificação da Vinícola Ouro Verde - BA.

Levando-se em consideração as questões ambientais e sendo esse resíduo uma fonte barata de compostos bioativos, é necessário que se realizem estudos acerca do aproveitamento desse material, para produção de ingredientes com valor agregado e que possam ser aplicados nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos, de alimentos e na produção de tintas anti-incrustantes (BONILLA et al., 1999; HOGAN et al., 2010b).

2.5. Bioincrustações e tintas anti-incrustantes

2.5.1. Bioincrustações

A fixação de organismos em qualquer material exposto ao ambiente marinho é conhecida como “*biofouling*” ou bioincrustação (ABARZUA; JAKUBOWSKI, 1995; NEBOT et al., 2007). Esses organismos incrustantes são caracterizados por viverem aderidos a um substrato consolidado durante a maior parte do seu ciclo de vida. Uma vez submersa no ambiente aquático, qualquer estrutura pode ser utilizada como substrato para o assentamento e o desenvolvimento desses organismos (Figura 11). A bioincrustação ocorre de maneira progressiva, seguindo o processo de sucessão ecológica, o qual se inicia pela formação de um biofilme de bactérias, seguido pelo assentamento de algas efêmeras, algas perenes e espécies animais

(MOLINO; WETHERBEE, 2008; MOLINO et al., 2009). O biofilme gerado é uma massa de micro-organismos com substâncias extracelular polimérica (EPS) formando uma matriz gelatinosa, promovendo interações enzimáticas, transferência de nutrientes, proteção ao estresse ambiental e aumento da resistência a biocidas.

As incrustações biológicas prejudicam o desempenho da navegação, aumentando o atrito das embarcações com a água, o gasto de combustível, a emissão de CO₂ e a frequência de docagens para limpeza (SILKINA et al., 2009; TURNER, 2010). Isto acarreta o investimento de bilhões de dólares anualmente para controle e limpeza de estruturas submersas (YEBRA et al., 2004). Uma camada de organismos com 1 mm de espessura chega a aumentar a fricção do casco com a água em até 80%, o que leva a diminuição de 15% na velocidade do navio, e ao aumento no consumo de combustível em até 17% (EVANS et al., 2000). Estes dados são economicamente alarmantes, tendo em vista que o combustível representa aproximadamente metade dos custos do transporte marítimo (CHAMP, 2000).



Figura 11. Formação de incrustações em superfície em contato com o mar. Fonte: <http://pt.dreamstime.com>.

2.5.2. Tintas anti-incrustantes

A estratégia mais empregada nas últimas décadas para prevenir a adesão de organismos sobre estruturas submersas consiste na utilização de tintas anti-incrustantes contendo biocidas. Essas tintas são aplicadas como sistemas de proteção, com a finalidade de combater a formação e o estabelecimento de comunidades bioincrustantes sobre superfícies expostas à água. Usualmente, tintas anti-incrustantes são aplicadas em embarcações comerciais e de passeio, plataformas petrolíferas, tubulações submarinas, comportas de represas, tanques destinados à aquicultura, entre outras (YEBRA et al., 2004).

Historicamente, são conhecidas 3 gerações de tintas anti-incrustantes. As tintas de primeira geração foram utilizadas desde meados do século XX até a década de 1970 e empregavam óxidos metálicos. Os óxidos de cobre e de zinco foram os primeiros biocidas utilizados regularmente em tintas anti-incrustantes, no entanto, as tintas à base de óxidos metálicos se tornavam ineficientes em menos de um ano e, portanto, biocidas mais efetivos foram necessários (GODOI et al., 2003; FERNANDEZ; PINHEIRO, 2007; MARTINS; VARGAS, 2013)

As tintas de segunda geração passaram a ser empregadas a partir de 1960 e incorporavam compostos organometálicos à base de estanho. As propriedades biocidas dos compostos triarilestânicos e triarilestânicos passaram a ser exploradas comercialmente. Em função da sua eficiência, as tintas à base de tributilestanho (TBT) e, mais tarde, de trifenilestanho (TPT) ganharam espaço no mercado (OMAE, 2003; OMAE, 2006). Na década de 1980, chegaram a revestir 90% dos cascos dos navios em operação no mundo. A preferência por estes anti-incrustantes se deu principalmente devido a sua grande eficiência e durabilidade, o período de docagens, em alguns casos, aumentou para cerca de 7 anos, o que diminuía significativamente os custos de manutenção das embarcações (ALMEIDA et al., 2007; CASTRO et al., 2011).

Apesar da alta eficiência, diversos efeitos ecotoxicológicos relacionados ao uso do TBT em sistemas anti-incrustantes, foram observados em áreas portuárias ao redor do mundo, algumas anomalias nos organismos marinhos como diminuição do número de jovens recém-fixados, afinamento das conchas das ostras e,

principalmente, imposex (desenvolvimentos de características masculinas, como pênis e canal deferente, em fêmeas de moluscos) (KETATA et al., 2008; GODOI et al., 2003; CHAMBERS et al., 2006; ALMEIDA et al.; 2007). Como consequência a Organização Marítima Internacional (OMI) propôs, em 2001, o banimento gradativo dessas tintas (GODOI et al., 2003; DI LANDA et al., 2006; MARTINS; VARGAS, 2013). O Brasil assinou essa convenção em 2002. (NORMAM-23/DCP 2007).

As tintas de terceira geração começaram a ser utilizada a partir de 1987 e contemplam 16 diferentes compostos biocidas que estão homologados pela OMI para utilização em embarcações. Estes compostos pertencem a diferentes classes químicas e, em alguns casos, são utilizados concomitantemente em uma mesma formulação comercial, restrito a mistura de no máximo 4 deles. Dentre os biocidas incorporados nos anti-incrustantes de terceira geração encontram-se compostos orgânicos não metálicos: Irgarol1051 (1), TCMS Piridina (2), Tiram (3), Clorotalonil (4), Diclofluanida (5), Diuron (6), DCOIT (7), Busan (TCMTB) (8) e Trifenilborano Piridina (9). Já os compostos metálicos (orgânicos e inorgânicos) homologados para utilização são: Cobre Piritona (10), Zinco Piritona (11), Óxido Cuproso (12), Ziram (13), Maneb (14), Naftenato de Cobre (15) e Tiocianato de Cobre (16) (Figura 12) (YEBRA et al., 2004; CASTRO et al., 2011).

Contudo, alguns estudos demonstram que a liberação destes biocidas para o meio em locais de grande fluxo de embarcações provoca danos ao ecossistema, afetando a biota em geral. Dessa maneira, áreas portuárias e sob a influência de marinas e estaleiros frequentemente apresentam níveis significativos de contaminação por biocidas oriundos de tintas anti-incrustantes de terceira geração (ALBANIS et al., 2002; MUKHERJEE et al, 2009; GATIDOU et al., 2007; DEMOLINER et al., 2010; AZEVEDO et al., 2004).

Com o aumento da preocupação com a poluição no ambiente marinho aliado ao aumento da pressão dos órgãos ambientais na implementação de novas leis que aumentem a fiscalização das substâncias tóxicas liberadas no mar, a busca por soluções menos poluentes vem aumentando exponencialmente. Uma grande variedade de compostos naturais vem sendo testada em formulações anti-incrustantes e anticorrosão, no intuito de poderem substituir com a mesma eficiência os compostos utilizados no passado e atualmente, que tantos danos causaram ao

meio ambiente (MEDEIROS et al., 2007; BURGUESS et al. 2003; DA GAMA et al., 2008).

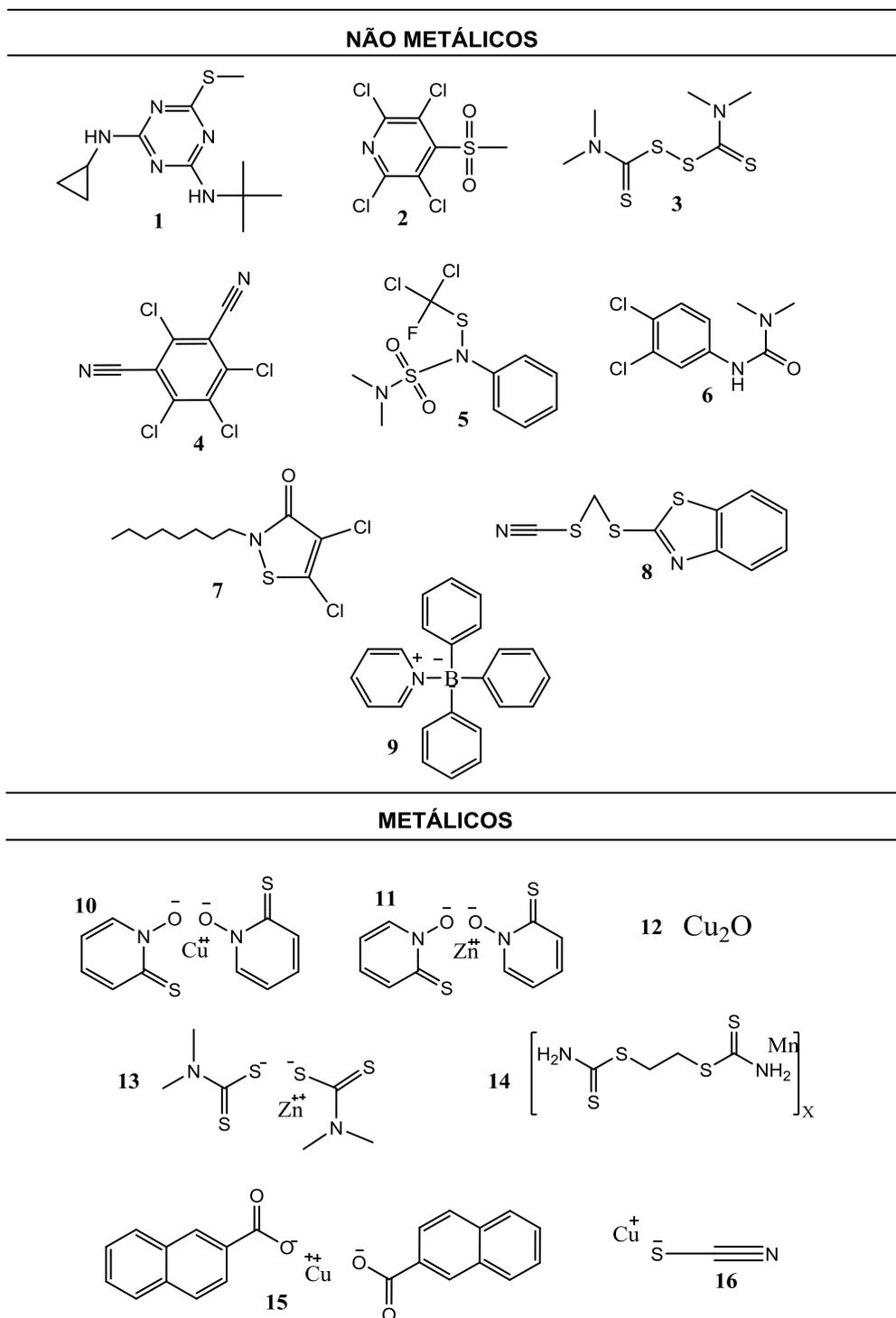


Figura 12. Biocidas homologados pela Organização Marítima Internacional (IMO) para utilização em tintas anti-incrustantes.

2.5.3. Cobre como biocida

O cobre é um biocida e vem sendo utilizado como agente anti-incrustante há bastante tempo. Após o banimento mundial dos anti-incrustantes à base de compostos organoestanhos, os produtos voltaram a incorporar em suas formulações grandes quantidades de compostos à base de cobre, com o intuito de potencializar o efeito biocida dessas novas tintas. Sendo assim, a maioria dos produtos disponíveis no mercado mundial atualmente utiliza o cobre associado a um ou mais biocidas. Uma das vantagens da utilização de tintas à base de cobre é o fato de ser um elemento que ocorre naturalmente na natureza e, em pequenas quantidades, é um micronutriente essencial para os seres vivos (SRINAVASAN & SWAIN, 2007).

No entanto, a preocupação em relação ao efeito do cobre no ambiente marinho tem aumentado. Isso porque o potencial tóxico dessas tintas já foi relatado em diversos trabalhos (KATRANITSAS et al., 2003; SAPHIER; HOFFMANN, 2005; JOHNSON et al., 2007). A toxicidade do cobre para organismos aquáticos está vinculada a fatores físico-químicos como pH, salinidade e concentração do metal (COUNCIL, 2012).

Para aumentar a eficiência do cobre e diminuir os danos à biota marinha têm-se testado vários compostos naturais. Dentre esses, os taninos ganharam bastante espaço nas pesquisas, por possuírem propriedades anticorrosão e anti-incrustante, por serem de fácil obtenção e ocorrem naturalmente em vegetais, frequentemente são encontrados nas cascas de frutas, madeira, raízes e sementes de diferentes espécies de plantas (KNOWLES; WHITE, 1958; COWAN, 1999; DE BRUYNE et al., 1999; NOOR IDORA et al., 2015).

Com o aumento da preocupação com a poluição no ambiente marinho aliado ao aumento da pressão dos órgãos ambientais na implementação de novas leis que aumentam a fiscalização das substâncias tóxicas liberadas no mar, a busca por soluções menos poluentes vem aumentando exponencialmente. O bagaço da vinificação do Vale de São Francisco é uma fonte rica em taninos que pode ser utilizada como fonte desses fenólicos para utilização em revestimentos anti-incrustantes.

2.6. Técnica de ionização e dessorção a laser assistida por matriz – MALDI-TOF

Técnicas de ionizações a laser foram introduzidas a partir da metade dos anos 80, cujo principal objetivo era obtenção de íons–moleculares (*quasi-moleculares* ou *pseudo-moleculares*) (KARAS; HILLENKAMP, 1988; TANAKA et al., 1988). MALDI (*Matriz-Assisted Laser Desorption/Ionization*) é uma técnica de ionização suave inicialmente desenvolvida para análises de macromoléculas, no entanto está se expandindo, enormemente, e já é bastante utilizada em análises de micromoléculas (EL-ANEED et al., 2009).

Basicamente, os processos de ionização em MALDI podem ser divididos em três etapas: 1) incorporação do analito numa matriz, que quando secos se cristalizam; 2) a excitação da matriz e produção da pluma por dessorção física/ablação e 3) a ionização do analito por reações íon-moléculas (KNOCHENMUSS; ZENOBI, 2003; DREISEWERD, 2003; HOLLE et al., 2006).

Em suma a transferência de energia por MALDI ocorre através da irradiação pulsada de laser, a matriz energizada converte a energia do laser em energia para a excitação do analito, promovendo sua ionização (Figura 13). Esta forma de transferência de energia é eficiente na obtenção de moléculas intactas, já que elas não sofrem incidência direta da energia do laser, o que poderia causar sua fragmentação. Este processo ocorre em uma câmara sob vácuo e os íons então formados na fase gasosa são acelerados por campos eletrostáticos em direção ao analisador (ARDREY, 2003; HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

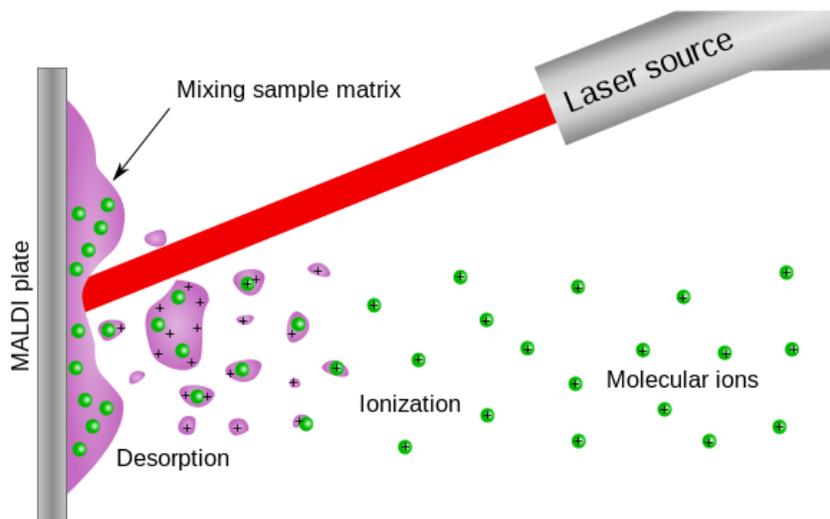


Figura 13. Representação de Ionização por MALDI

Existe uma grande variedade de matrizes que podem ser utilizadas em MALDI, constituídas principalmente de compostos aromáticos tais como DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzóico), CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinamico), DHAP (2,5-dihidroxiacetofenona), THAP (2,4,6-Trihidroxiacetofenona), ácido nicotínico, ácido picolínico, ácido ferúlico, e outros. Há também diferentes tipos de lasers usados em MALDI, como o nitrogênio, Nd:YAG, que são os mais comuns. Os íons formados apresentam-se, geralmente protonados monocarregados em modo positivo, e os desprotonados monocarregados em modo negativo. Contudo, não é incomum de serem formados íons com duas ou mais cargas, ou com adutos de Na^+ ou K^+ (HOFFMANN; STROOBANT, 2007; SILVA et al., 2016).

Embora existam várias aplicações de MALDI em química de produtos naturais, o maior número de publicações com MALDI de baixa ou alta resolução é relacionado a sua utilização para determinação estrutural de compostos de alto peso molecular. Várias classes de metabólitos secundários, glicosilados ou não, são analisados por MALDI, tais como taninos hidrolizáveis e condensados, antocianinas, alcaloides, flavonoides, saponinas, rotenoides, carotenoides, xantofilas, triterpenos, teaflavinas, tearubiginas, fenólicos, lactonas sesquiterpênicas, esteróides, diterpenos, glicosídeos cianogênicos, entre outros (SILVA; LOPES, 2015;

KAUFMANN et al., 1996; WANG, et al., 2000; MARCZAK et al., 2008;FRISON-NORRIE; SPORNS, 2002; MAY et al., 2005; IVANOVA; SPITELLER, 2014; HARVEY, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Avaliar a composição dos constituintes químicos dos resíduos produzidos no processo de vinificação através de análises cromatográficas e espectroscópicas.
- Desenvolver aditivos anti-incrustante para tintas e revestimentos navais a partir de resíduos da indústria vinícola (*Vitis* sp.) provenientes da região do Vale do São Francisco, Nordeste brasileiro.

3.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar estruturalmente os prováveis marcadores químicos dos resíduos;
- Preparar e caracterizar complexos de íon de cobre com os extratos ricos em fenólicos, obtidos dos resíduos do processo de vinificação;
- Avaliar a toxicidade dos extratos e complexos resíduos de uva-cobre frente ao micro crustáceo *Artemia salina*;
- Avaliar a eficácia da tinta com o aditivo dos complexos resíduo uva-cobre como agente anti-incrustante.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta do Material Vegetal

As amostras dos bagaços das uvas (cascas e sementes) das cultivares Moscato e Shiraz foram coletadas em 2012 e 2013, respectivamente, na vinícola Ouro Verde situada em Casa Nova/Ba - Região do Vale do São Francisco (Figura 14).



Figura 14. Vinícola Ouro Verde e resíduos coletados para análise.

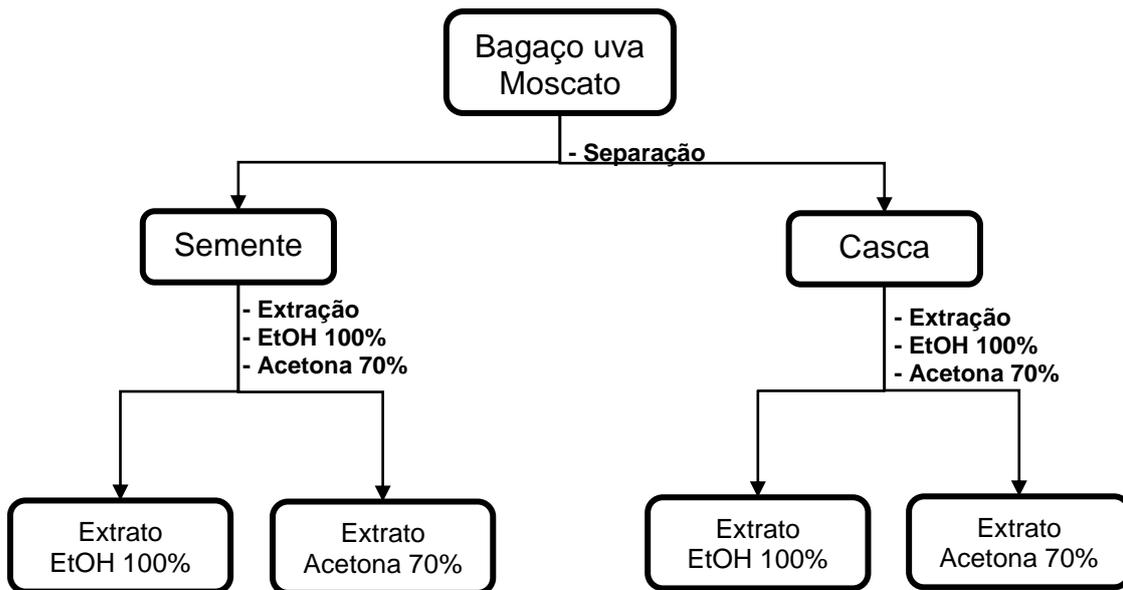
4.2. Obtenção dos extratos brutos

Inicialmente as amostras do bagaço foram desidratadas em estufa com circulação e remoção de ar a 40 °C. O bagaço da uva Moscato foi separado, manualmente, em casca e semente. Já para o bagaço da uva Shiraz optou-se por trabalhar com o mesmo da forma que foi coletado. Em seguida todas as amostras foram trituradas em moinho de facas até obtenção de um pó.

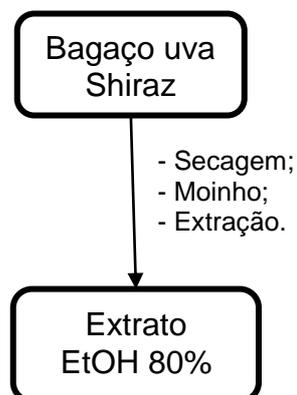
A extração do cultivar Moscato, semente e casca, foi realizada usando etanol (100%) e acetona (70%), assim foram obtidos os extratos brutos Moscato semente EtOH, Moscato semente acetona 70%, Moscato casca EtOH, Moscato casca

acetona 70% (ROCKENBACH et al., 2008) (Esquema 1). A extração do bagaço, semente + casca, da cultivar Shiraz foi realizada utilizando etanol 80% (Esquema 2).

As amostras secas foram submetidas ao processo de extração em ultrassom. As soluções extrativas obtidas foram recuperadas por filtração e concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida à temperatura de 40 °C.



Esquema 1. Obtenção dos extratos bagaço uva Moscato.



Esquema 2. Obtenção do extrato do bagaço da uva Shiraz.

4.3. Análise do teor de fenólicos, flavonoides, antocianinas e taninos dos resíduos das uvas Moscato e Shiraz

4.3.1. Teor de fenólicos totais

A análise do teor de fenólicos totais foi utilizada como parâmetro para selecionar, no caso da uva Moscato, quais extratos, etanólico ou acetona/água, seriam utilizados no desenvolvimento do trabalho. O teor de fenólicos totais dos extratos do bagaço das uvas Moscato e Shiraz foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (SLINKARD; SINGLETON, 1977) com modificações, empregando-se o ácido gálico como composto fenólico padrão. A desprotonação dos compostos fenólicos em meio básico, gera os ânions fenolatos. A partir daí, ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o reagente de Folin (Figura 15), na qual o molibdênio, componente do reagente de Folin, sofre redução e o meio reacional muda de coloração amarela para azul (SINGLETON et al., 1999). (SINGLETON et al., 1999)

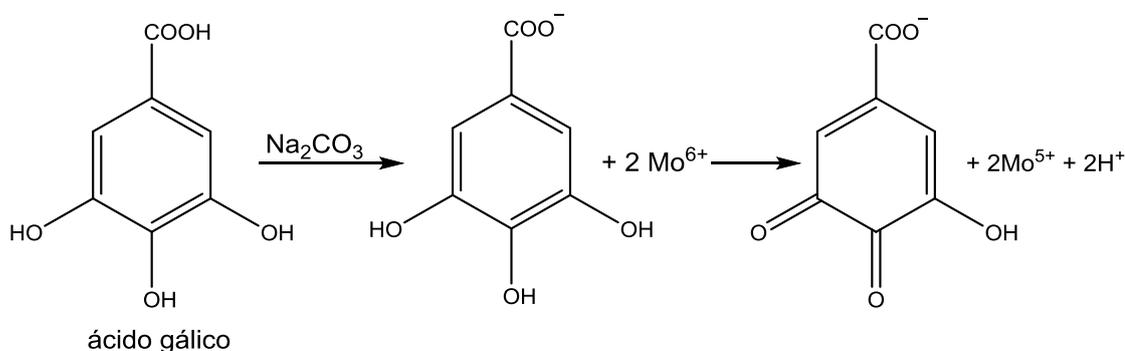


Figura 15. Reação do ácido gálico com o molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.

Além dos quatro extratos de Moscato também foi analisado o extrato do bagaço da uva Shiraz. Inicialmente os extratos, obtidos das uvas Moscato e Shiraz, foram solubilizados em etanol nas concentrações 1,0 e 5,0 mg/mL. Uma alíquota de 50 μL de cada solução foi transferida para um Eppendorf, adicionando-se 20 μL do reagente de Folin-Ciocalteu e 870 μL de água destilada, agitando-se por 1 min. Em

seguida, 60 µL da solução de Na₂CO₃ (15%) foram acrescentados à mistura e agitados por 30 segundos, resultando na concentração final de 50 µg/mL para as amostras. Após duas horas, a absorvância de cada amostra foi medida em espectrofotômetro ELISA UV-Vis em 760 nm. As análises foram realizadas em triplicata e o teor de fenólicos totais (FT) foi determinado por interpolação da absorvância das amostras em curva de calibração construída com soluções do padrão do ácido gálico em várias concentrações (1,0 a 12,5 µg/mL) e expressos como miligrama equivalente ao ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g), considerando-se o erro padrão da média (E. P. M.). A equação da curva de calibração do ácido gálico foi: $y = 0,0773x + 0,0642$, com o coeficiente de correlação de $r^2 = 0,999$, onde x é a concentração do ácido gálico e Y é a absorvância a 760 nm.

4.3.2. Teor de flavonoides

Para a quantificação do teor de flavonoides, foram utilizados apenas os extratos selecionados no teste de fenólicos totais (dois extratos da uva Moscato e o do bagaço das uvas Shiraz). A determinação de flavonoides seguiu a metodologia proposta por Woisky e Salatino (1998) com modificações, empregando-se a quercetina como composto fenólico padrão. Na reação, o íon alumínio (Al³⁺) complexase com as moléculas de flavonóides da amostra, estabelecendo o complexo estável flavonóide-Al³⁺ de coloração amarela cuja intensidade é proporcional à concentração de flavonóide presente na amostra (MABRY et al., 2012). Esta complexação promove, em espectroscopia, deslocamento batocrômico e intensificação das absorções, podendo ser quantificado sem sofrer influência de outros compostos fenólicos presentes na amostra (Figura 16) (WOISKY; SALATINO, 1998).

Inicialmente foram pipetados 200 µL de cada amostra testada, na concentração de 5,0 mg/mL cada, em Eppendorfs de 1,0 mL, individualmente. Após a adição do extrato, adicionou-se 600 µL de MeOH e 200 µL cloreto de alumínio 5% m/v em metanol, resultando na concentração final de 1000 µg/mL para as amostras. Preparou-se o branco utilizando 800 µL de metanol e 200 µL de cloreto de alumínio.

Aguardou-se 30 minutos no escuro e a leitura foi realizada em espectrofotômetro ELISA UV-Vis em 425 nm. As análises foram realizadas em triplicata e o teor de flavonoides foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com soluções do padrão de quercetina em várias concentrações (2,5 a 20,0 µg/mL) e expressos como miligrama equivalente a quercetina por grama de extrato (mg EQ/g), considerando-se o erro padrão da média (E. P. M.). A equação da curva de calibração da quercetina foi: $y = 0,0593x + 0,101$, com o coeficiente de correlação de $r^2 = 0,999$, onde x é a concentração de quercetina e Y é a absorbância a 425 nm.

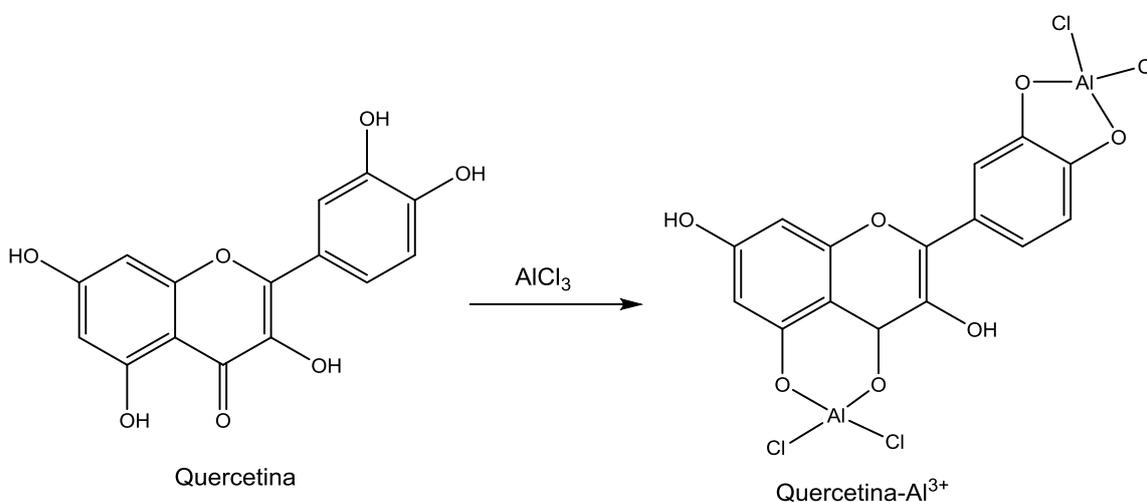


Figura 16. Esquema ilustrado da complexação do flavonóide quercetina com cloreto de alumínio (AlCl₃) o qual forma o complexo estável flavonóide-Al³⁺ (WOISKY; SALATINO, 1998).

4.3.3. Quantificação das antocianinas monoméricas

Para a quantificação de antocianinas monoméricas, utilizou-se apenas os extratos selecionados no teste de fenólicos totais (dois extratos da uva Moscato e o do bagaço das uvas Shiraz). A determinação foi realizada pelo método de pH diferencial (CPFAC, 2006). Este método se baseia na mudança de pH da solução que provoca transformações estruturais reversíveis nas antocianinas. Essas mudanças são evidenciadas através das diferenças nos valores de absorbância no

espectrofotômetro. A forma do oxônio colorido predomina em pH 1,0 e o hemiacetal descolorido predomina em pH 4,5 (Figura 17). Esta reação permite medidas rápidas e precisas das antocianinas totais.

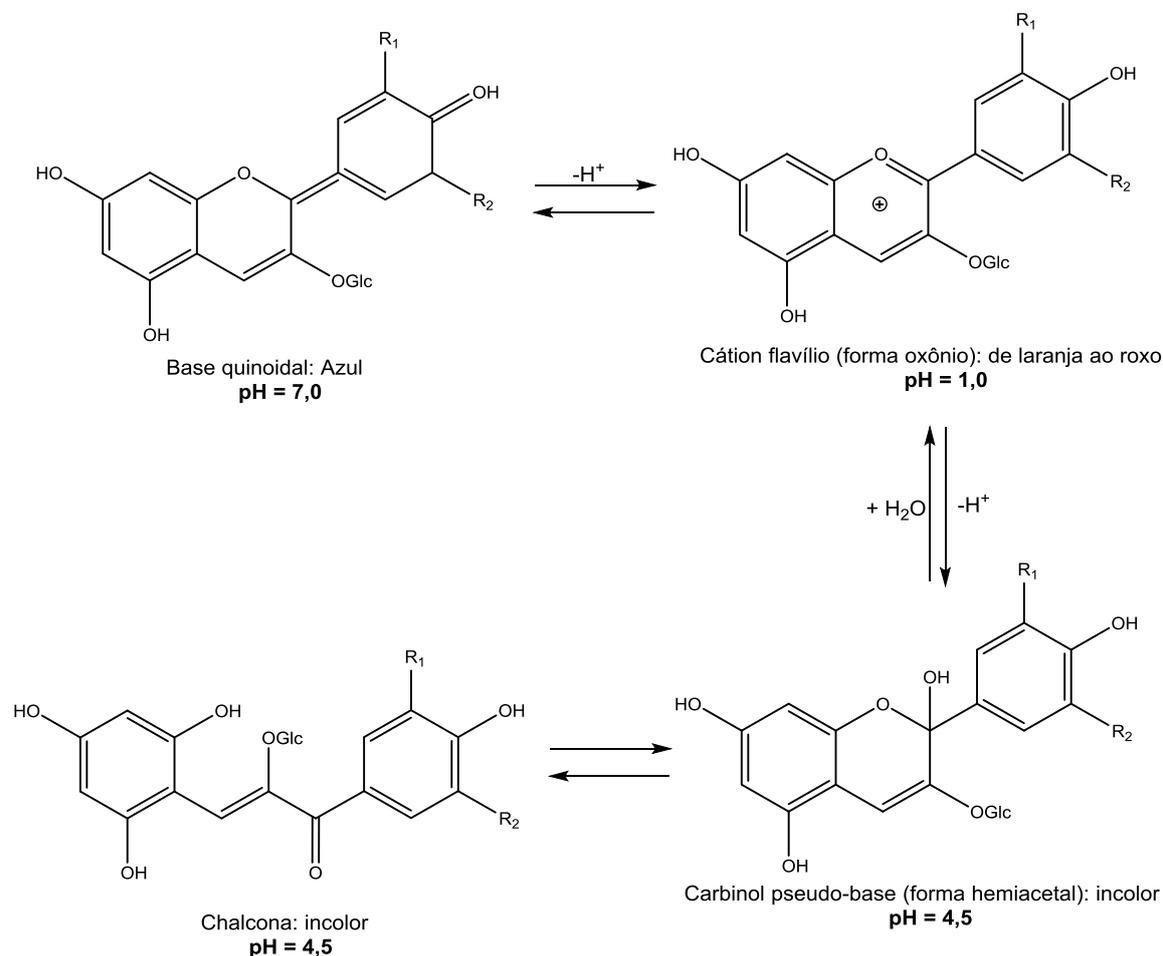


Figura 17. Formas estruturais de antocianinas em diferentes valores de pH. Fonte: Giusti e Wrolstad, 2001.

Determinou-se o fator de diluição das amostras, através da diluição com tampão cloreto de potássio, pH 1,0 no comprimento de onda de 510 nm até a absorvâncias da amostra estar na faixa de linearidade do espectrofotômetro. Dividindo o volume final da amostra pelo volume inicial, se obtém o fator de diluição. Para não exceder a capacidade do tampão a amostra não deve ser mais que 20% do volume total. O aparelho foi zerado com água destilada em todos os comprimentos de ondas utilizados (510 nm e 700 nm). Foram preparadas, em triplicata, diluições das amostras, uma com o tampão de cloreto de potássio

(0,025M, pH 1) e a outra com o tampão acetato de sódio (0,4M, pH 4,5) diluindo cada uma pelo fator de diluição previamente determinado. Os pH foram ajustados com ácido clorídrico concentrado. As diluições foram equilibradas por 15 minutos. A leitura das amostras foi realizada em cubeta de quartzo a 510nm e 700nm num espectrofotômetro.

As absorbâncias das diluições foram calculadas através da seguinte equação:

$$A = (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1,0} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4,5}$$

A concentração das antocianinas monoméricas na amostra original foi calculada através da seguinte formula: Antocianinas monoméricas (mg/L) = $(A \times \text{PM} \times \text{FD} \times 1000) / (\epsilon \times 1)$. Onde PM é o peso molecular, FD é o fator de diluição e ϵ é a absorvidade molar da cianidina-3-glicosídeo. (PM = 449g, ϵ = 26 900).

4.3.4. Teor de taninos condensados

Para a quantificação do teor de taninos condensados, utilizou-se apenas os extratos selecionados no teste de fenólicos totais (dois extratos da uva Moscato e o do bagaço das uvas Shiraz). A determinação do Teor de Taninos condensados foi realizada utilizando o método colorimétrico que se baseia na reação da vanilina com taninos em meio ácido (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006). Uma alíquota de 300 μL de uma solução de vanilina em ácido sulfúrico 70% (1% m/v, preparada na hora do teste) foi adicionada a quantidades apropriadas das amostras, diluídas em etanol. A mistura foi incubada a 20°C, em banho-maria, por 15 minutos. A absorbância de cada amostra foi medida em espectrofotômetro de Elisa UV-Vis em 500 nm, empregando-se placas de 96 poços. As análises foram realizadas em triplicata e o teor de taninos condensados (proantocianidinas) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com soluções do padrão de catequina em várias concentrações (5,0 a 40,0 $\mu\text{g/mL}$) e expressos como miligrama equivalente de catequina por grama de extrato (mg EC/g), considerando-se o erro padrão da média (E. P. M.). A equação da curva de calibração da catequina foi: $y = 0,0133x + 0,2241$, com o coeficiente de correlação $r^2 = 0,989$, onde x é a concentração de catequina e Y é a absorbância a 500 nm.

4.3.5. Teor de taninos hidrolisáveis (galotaninos)

Para a quantificação do teor de galotaninos, utilizaram-se apenas os extratos selecionados no teste de fenólicos totais (dois extratos da uva Moscato e o do bagaço das uvas Shiraz). A determinação do Teor de galotaninos foi realizada utilizando o método colorimétrico que se baseia na reação do iodato de potássio com os ésteres galoil. A reação forma um intermediário vermelho (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006). Uma alíquota de 300 µL de uma solução saturada de iodato de potássio foi adicionada a quantidades apropriadas das amostras, diluídas em etanol. A mistura foi incubada a 15°C por 10 minutos. A absorbância de cada amostra foi medida em espectrofotômetro de Elisa UV-Vis em 550 nm, empregando-se placas de 96 poços. As análises foram realizadas em triplicata e o teor de galotaninos foi determinado por interpolação da absorbância das amostras em curva de calibração construída com soluções do padrão ácido tânico em várias concentrações (5,0 a 40,0 µg/mL) e expressos como miligrama equivalente de ácido tânico por grama de extrato (mg EAT/g), considerando-se o erro padrão da média (E. P. M.). A equação da curva de calibração do ácido tânico foi: $y = 0,0542x + 0,1915$, com o coeficiente de correlação $r^2 = 0,995$, onde x é a concentração de ácido tânico e Y é a absorbância a 500 nm.

4.3.6. Tratamento estatístico

Todas as amostras foram analisadas em triplicata e os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As amostras foram submetidas a análises de variância (ANOVA), as diferenças com $P < 0.05$ foram consideradas significantes.

4.4. Análises dos extratos obtidos dos resíduos das uvas Moscato e Shiraz por massas de alta resolução (MALDI-TOF)

A caracterização química por MALDI-TOF foi realizada nos extratos do bagaço de uva Shiraz (EtOH 80%) e das cascas (acetona 70%) e semente (EtOH 100%) da uva Moscato, esses extratos foram selecionados após a análise do teor de fenólicos.

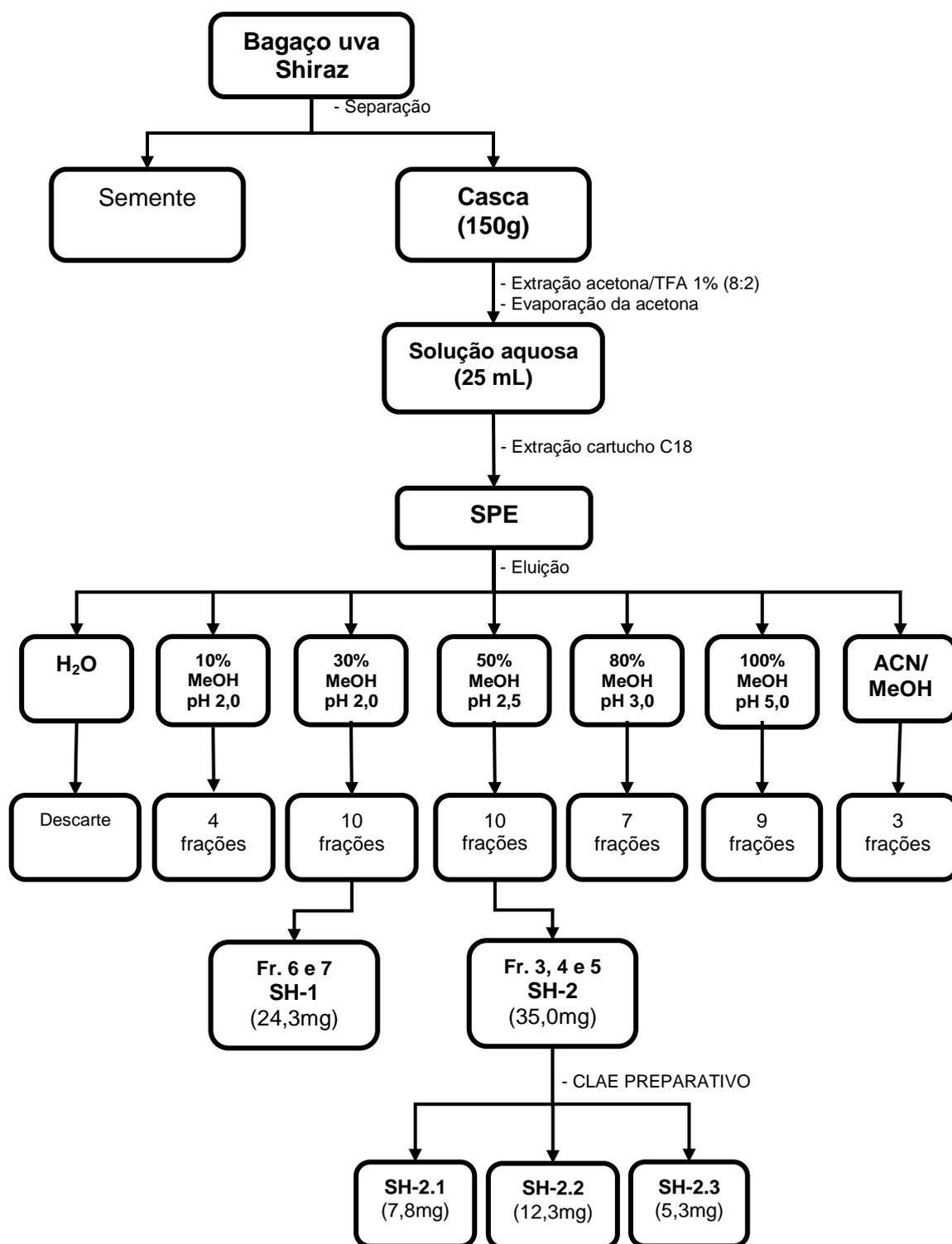
Os espectros de massa (MS) foram obtidos utilizando um espectrômetro de massa MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Uma mistura de péptidos foi utilizada para calibração interna e externa (padrão de calibração péptido II [Bruker Daltonics]: Bradicinina 1-7, Angiotensina II e I, Substância P, Bombesina, Substrato de renina, ACTH clip de 1-17, ACTH clip de 18-39, e Somatostatina 28). Os íons foram gerados por irradiação com um laser Smartbeam Nd:YAG, 355 nm e acelerado a 19 kV. Para as análises de MS, as condições experimentais foram: extração pulsada de íons, a frequência do laser de 100 Hz, em modo refletido positivo, 500 disparos de laser foram realizados para registrar o espectro de massa. Além disso, os íons selecionados foram acelerados a 19 kV, no método LIFT para análises de MS/MS. A matriz de escolha foi DHB (ácido 2,5-di-hidroxibenzóico) a 20 mg/mL, diluído em uma solução de acetona (70%) e TFA 0,1% (30%), ambos da sigma. Todas as amostras testadas foram diluídas no mesmo solvente da matriz, na concentração de 5,0 mg/mL, e misturou-se com DHB (volume matriz : amostra = 2:1). Estas misturas (1 µl) foram aplicadas na placa MALDI (MTP 384 ground steel, Bruker) e deixada em temperatura ambiente até secar (a amostra foi cristalizada com a matriz). Os compostos foram identificados por dados de MS, via fragmentação e medições de massa utilizando o calibrante interno (mistura de péptidos padrão).

4.5. Isolamento e identificação das principais antocianinas presentes no resíduo da uva Shiraz coletada na região do Vale do São Francisco

Para o isolamento das antocianinas do resíduo da uva Shiraz foi feita a separação da casca e semente. Com as cascas foi realizada uma nova extração

utilizando 150,0 g que foram moídas e extraídas com 400,0 mL de uma solução de acetona e TFA 1% (8:2) por 15 minutos em ultrassom, a extração foi realizada em triplicata. A solução extrativa foi filtrada e a acetona foi evaporada em rotavapor a 35 °C, resultando em uma solução aquosa de onde foram isoladas as antocianinas.

A solução aquosa (25 mL), foi submetida a extração em fase sólida em cartucho de SPE C-18, previamente ativado (10 mL de MeOH, seguido de 10 mL de água). Após a adição da amostra no cartucho, foi utilizado água para retirada dos açúcares, seguido por 10 % de MeOH (0,1% TFA pH 2), 30 % de MeOH (0,1% TFA pH 2), 50 % de MeOH (0,1% TFA pH 2,5), 80 % de MeOH (0,1% TFA pH 3), 100 % de MeOH (0,1% TFA pH 5) e MeOH (0,1% TFA ACN, 1:1). Ao todo foram obtidas 43 frações. Após análise por CCDA as frações 6 e 7 (30 % MeOH 0,1% TFA) (**SH-1**), apresentaram formação de precipitado e foram reunidas (24,3 mg) e realizados os espectros de massas e RMN. As frações 3, 4 e 5 (50 % MeOH , 0,1% TFA) (**SH-2**) foram reunidas (35,0 mg) e foram analisadas por CLAE-DAD, analítico e preparativo. Da fração **SH-2**, foram isoladas 3 substâncias denominadas **SH-2.1**, **SH-2.2** e **SH-2.3** (Esquema 3). As demais frações obtidas foram agrupadas e armazenadas sob refrigeração.



Esquema 3. Isolamento das principais antocianinas presentes no bagaço da uva Shiraz

A análise por CLAE-DAD foi realizada utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu Prominence LC-20AT com um detector de arranjo de diodos (SPDM20), forno CTO-20A e degaseificador DGU-20A5. Foi utilizado o injetor automático SIL-20AC para a corrida analítica, e injetor manual para a corrida preparativa. A separação cromatográfica foi feita, inicialmente, em coluna analítica Kinetex Cor-Shell C-18 (150 mm x 4,6 mm x 2,7 µm, Phenomenex). Foi utilizado como fase móvel a mistura de H₂O 0,1% TFA (Solvente A) e ACN 0,1% TFA (Solvente B), com sistema de eluição: 0-10 min, 20-50 % de B, 10-20 min, 50-100% de B, 25 min, 100% de B. Fluxo de 1,5 mL/minuto e temperatura de 40°C. O isolamento das antocianinas foi realizado com coluna preparativa Kinetex Cor-Shell C-18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm, Phenomenex), nas mesmas condições em um fluxo de 16,0 mL/minuto. Para monitoramento foram utilizados os comprimentos de onda de 320 nm e 520 nm. Para a filtração das amostras foram utilizados filtros de nylon (Whatman) 0,45 µm. Todos os solventes utilizados foram grau CLAE. Após a coleta dos picos o solvente foi evaporado com o auxílio de rotaevaporador.

4.6. Síntese e caracterização do complexo do resíduo uva-cobre

Para a síntese e padronização do complexo resíduo uva/cobre, foram utilizados 1,0 – 1,1 g dos extratos selecionados dos bagaços das uvas em 100 - 150 mL de água a uma temperatura de 60°C. Esta solução, simultaneamente, com 20 – 60 mL de uma solução de sulfato cúprico 1,0 M, foram adicionadas a um Becker, contendo uma solução de Hidróxido de sódio (NaOH) 0,04 M, previamente aquecido à 60°C. A mistura então permaneceu na temperatura de 60°C sob agitação constante, até a formação de precipitado do complexo metálico (PÉREZ et al., 2006). Após a precipitação, o pH foi ajustado até aproximadamente 5,5 com solução de Hidróxido de potássio (KOH) 40%. Em seguida, a solução foi filtrada e o precipitado recolhido e lavado com água destilada, recolhido e seco em estufa, em uma temperatura de 50 °C por aproximadamente 24 h (Figura 18). Após a secagem, o precipitado apresentou-se como um pó marrom-esverdeado. Foi obtido assim, o complexo resíduo-cobre do extrato hidroacetônico das cascas da uva Moscato (RCMC – Resíduo-Cobre Moscato Casca), do extrato etanólico da semente da uva

Moscato (RCMS - Resíduo-Cobre Moscato Semente) e do extrato hidroalcolico do bagaço da uva Shiraz (RCSB - Resíduo-Cobre Shiraz Bagaço). Todas as amostras foram realizadas em triplicata. Para síntese do aditivo para fabricação da tinta foram utilizados 20-40g de extratos da uva.

A presença do derivado com cobre foi observada pela análise dos espectros de Infravermelho obtido com pastilha KBr ($4000-600\text{ cm}^{-1}$). Foi utilizado um espectrômetro FTIR Varian 640-IR.

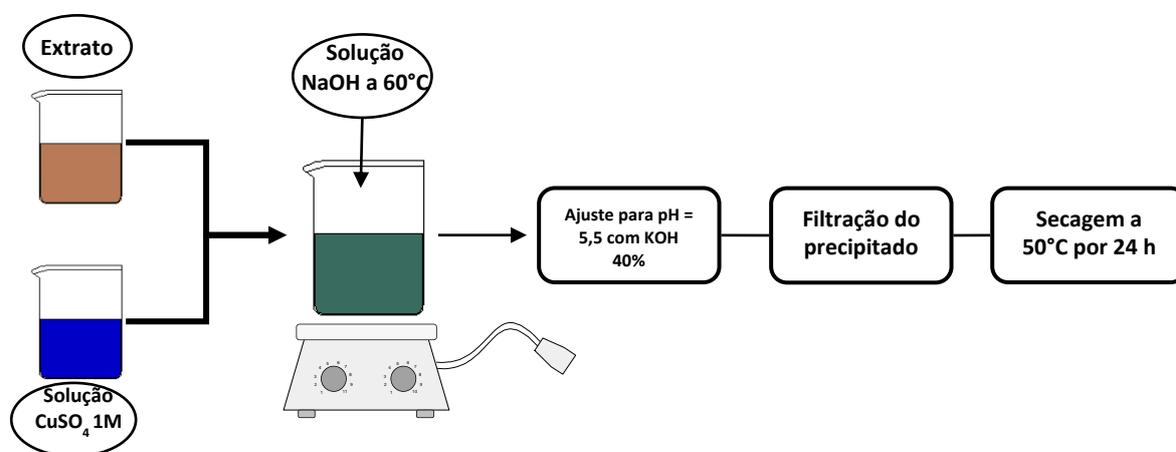


Figura 18. Ilustração da síntese do complexo resíduo uva-cobre.

4.7. Avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina*

Por se tratar de uma espécie de fácil manutenção em condições de laboratório e de ampla distribuição, o micro crustáceo *Artemia sp.* tem sido largamente utilizado em testes de toxicidade. O teste com *Artemia sp.* consiste na exposição dos náuplios na fase II ou III durante 24, 48 e/ou 72 horas a concentrações crescentes da amostra que se pretende testar com análise do número de organismos mortos ao final do período de exposição (VEIGA; VITAL, 2002). O ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* é um ensaio biológico rápido, de baixo custo, não requer ambiente asséptico, utiliza um grande número de

organismos para validação estatística, não requer equipamentos especiais e a quantidade de amostra é relativamente pequena (DOLABELA, 1997).

Os ovos de *A. salina*, adquiridos comercialmente, foram colocados em um recipiente contendo água marinha e foram incubados por 48 horas para eclodirem. Durante todo o processo foi mantida iluminação (20 W) sobre o recipiente.

O estudo foi realizado com os extratos das amostras selecionadas, bem como com os complexos resíduo-cobre que foram preparados. Todas as amostras analisadas foram preparadas a uma concentração de 20 mg/mL em água ultrapura. Em seguida, foram adicionadas, em tubos de ensaio, quantidades apropriadas das soluções e o volume completado para 5 mL com água do mar. Foram feitas 6 concentrações de cada amostra que variaram de 0,2 a 5,0 mg/mL. A cada tubo de ensaio foram adicionados de 10 a 12 larvas do microcrustáceo *A. salina*. Após 24, 48 e 72 horas, o número de microcrustáceos vivos e mortos em cada diluição (concentração) foi contado com auxílio de lupa e iluminação incandescente. Como controle negativo, foi utilizada apenas água marinha. A leitura dos resultados foi validada somente quando nos controles negativo ocorreu à sobrevivência de todos os indivíduos. Todas as amostras foram realizadas em triplicata.

Aos dados de porcentagem de larvas de *Artemia salina* mortas, em relação ao aumento da concentração dos extratos, ajustou-se uma equação linear simples, a qual foi utilizada para estimar a concentração de extrato responsável por matar 50% das *Artemias* valor representativo da CL_{50} . Utilizou-se método gráfico de análise para obtenção da CL_{50} (dose letal do extrato para 50% da população). O teste foi acompanhado de um controle negativo, somente com água salina.

4.8. Determinação do teor de cobre (Cu) dos complexos resíduos de uva-cobre por absorção atômica

O teor de cobre nas amostras foi determinado por meio de um espectrofotômetro de absorção atômica com chama de ar/acetileno oxidante (Varian, Modelo AA240FS), com corretor de deutério, utilizando lâmpada de cátodo oco de cobre (324,8 nm). Empregaram-se padrões de cobre nas concentrações 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0; 7,0 e 8,0 ppm. Para as análises das amostras de complexos

resíduos de uva-cobre foram utilizadas 50 mg de cada amostra diluídas em 5 mL de ácido nítrico, para realização da digestão. Em seguida, 5 mL de água destilada foi adicionada, obtendo-se uma solução na concentração de 5 mg/mL que foi diluída até uma concentração de 0,01 mg/mL na qual foi realizada a análise. O teor de cobre que os complexos obtidos, possivelmente, liberam na água do mar nos testes com *Artemia salina*, também foi analisado, neste caso, foram pesados 5,0 e 2,5 mg dos complexos e foi adicionado 15 mL de água do mar, após 24h o material foi filtrado e novamente adicionado 15 mL de água salina que foi filtrada com 48h, da mesma forma foi colocado mais 15 mL e filtrada após 72h, em seguida foi feita a análise do teor de Cu liberado, por absorção atômica. As análises foram realizadas em triplicata e o teor de cobre foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com soluções do padrão de cobre. A equação da curva de calibração do cobre foi: $y = 0,0726x + 0,0136$, com o coeficiente de correlação $r^2 = 0,999$, onde x é a concentração de cobre e Y é a absorbância da amostra.

4.9. Preparação da tinta anti-incrustante

O pigmento anti-incrustante foi formulado para fornecer tintas à base de solvente orgânico com concentração do pigmento anti-incrustante de 1 a 20 % em volume, carbonato de cálcio, entre 1 e 15 % em volume, resina de pinheiro (colofônio) entre 5 e 20 %, estearato de alumínio, 25 % sobre a massa total, solvente (xileno/benzina 4:1) 50 % em volume. Os sólidos foram triturados em moinho de bolas de porcelana por 24h e peneirados em tamiz mesh 50. O solvente foi acrescentado à mistura de sólidos e a suspensão foi mantida em agitação por 48h, em temperatura ambiente. A preparação das tintas foi realizada pelos professores Patrícia Araújo (DEB-UFPE) e Elmo Araújo (DEN-UFPE).

4.10. Preparação das placas e avaliação do poder anti-incrustante em ambiente marinho (teste de imersão)

As placas foram preparadas para realização do teste de imersão *in situ* no litoral do Rio Grande do Norte, em Extremoz. As placas de acrílico de (8cm×16cm) foram previamente lixadas, lavadas com detergente e álcool e secas ao ar. Em seguida a formulação com o complexo de cobre foi aplicada sobre as superfícies das placas, obtendo-se camadas uniformes. A tinta apresentou boa homogeneidade. A preparação das placas foi realizada pelos professores Patrícia Araújo (DEB-UFPE) e Elmo Araújo (DEN-UFPE).

O experimento foi realizado em tanques na unidade experimental do setor de pesca da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. O local foi escolhido por ser rico em nutrientes e por apresentar proliferação rápida de cracas. As placas revestidas foram mantidas em profundidades entre 0,5 e 1,0m da superfície (Figura 19). O experimento foi realizado em três tempos diferentes utilizando concentrações diferentes do complexo de cobre com o resíduo. Como controle positivo foi utilizado o tanato de cobre, já conhecido por apresentar atividade *antifouling* (NOOR IDORA, et al., 2015). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. O teste de imersão foi realizado com a colaboração de José Aldair Sarmiento, Maria José Sarmiento, Adonias Ferreira e Adriano Rodrigues.

Para a avaliação do poder anti-incrustante foi considerado o peso das incrustações formadas nas placas de testes. Após o período de imersão as placas foram lavadas cuidadosamente, para a retirada da areia e ou lama, em seguida foram secas completamente e pesadas.



Figura 19. Placas com as tintas e local do teste de imersão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Rendimentos e seleção dos extratos brutos

Na extração das sementes e cascas da uva Moscato foi obtido um rendimento maior para a extração com etanol quando comparado com a extração acetona/água (7:3). Para a semente o rendimento foi 22% maior em relação à extração com acetona/água (7:3) e para a casca foi de aproximadamente 8%. O rendimento da extração depende tanto do solvente utilizado como do método aplicado, que pode ser baseado em mecanismos químicos diferentes (OU, et al., 2001; YU et al., 2002; YILMAZ; TOLEDO, 2004). Além do rendimento, há grande variação na composição química do extrato em função do sistema de solvente utilizado (MOURE et al., 2001). Apesar do bom rendimento dos extratos etanólicos, o interesse é no teor de fenólicos totais, nesse sentido todos os extratos foram avaliados quanto ao teor de fenólicos totais que foi utilizado como parâmetro para selecionar, no caso da uva Moscato, quais extratos seriam utilizados como aditivo para a tinta. Para a uva Shiraz foi obtido um rendimento de 54,03%. Os resultados dos rendimentos dos extratos estão na Tabela 1.

Tabela 1. Rendimentos dos extratos obtidos das sementes e cascas da uva Moscato e bagaço de Shiraz.

Variedade de uva	Parte analisada	Solvente	Rendimento
Moscato	Semente	Acetona/H ₂ O (7:3)	20,74%
		Etanol	42,97%
	Casca	Acetona/H ₂ O (7:3)	23,45 %
		Etanol	31,14 %
Shiraz	Bagaço	Etanol/H ₂ O (8:2)	54,03%

Os resultados para o teor de fenólicos totais dos extratos da casca e semente (Moscato) e bagaço (Shiraz) analisados encontram-se na Tabela 2, na qual se pode observar que os extratos, apesar do processo de vinificação, apresentaram altos

teores de fenólicos totais. O extrato etanólico da semente da uva Moscato foi o que apresentou maior teor de fenólicos totais com $423,81 \pm 1,72$ mg equivalente de ácido gálico por g de extrato (mgEAG/g de extrato), em contrapartida, o extrato etanólico da casca da mesma cultivar apresentou o menor teor $59,03 \pm 0,81$ mg EAG/g de extrato. Segundo Monrad e colaboradores (2010), após a produção de sucos e vinhos, o bagaço retém quantidades significativas de polifenóis, com uma quantidade que varia de 20-30% nas cascas e de 60-70% nas sementes. Além disso, o alto valor de fenólicos encontrado nas sementes pode ser atribuído à presença de uma grande quantidade de ácido gálico, catequinas e epicatequinas, que são bastante comuns em sementes de frutas (YILMAZ; TOLEDO, 2004; GUENDEZ et al., 2005a; GUENDEZ et al., 2005b; JAYAPRAKASHA et al., 2001).

Tabela 2. Teor de Fenólicos Totais dos extratos da semente e casca da uva Moscato e do bagaço da Shiraz, em mg EAG/g de extrato.

Variedade de uva	Parte analisada	Solvente	Teor de Fenólicos Totais (mg EAG/g)
Moscato	Semente	Acetona/H ₂ O (7:3)	$135,60 \pm 2,82$
		Etanol	$423,81 \pm 1,72$
	Casca	Acetona/H ₂ O (7:3)	$104,49 \pm 2,90$
		Etanol	$59,03 \pm 0,81$
Shiraz	Bagaço	Etanol/H ₂ O (8:2)	$133,92 \pm 1,99$

Observa-se também que, ao compararmos os solventes extratores, para a semente o etanol se mostrou mais eficiente, tanto no rendimento do extrato quanto na extração dos polifenóis, que o sistema hidroacetônico utilizado. Já para a casca o sistema acetona 70% (v,v) apresentou maior eficiência na extração dos fenólicos que o etanol. De maneira geral, para que a extração dos fenólicos seja eficaz é necessário que as características físico-químicas dos sistemas de solventes se assemelhem em maior grau as características da maioria dos compostos fenólicos presentes nas amostras testadas (ROCKENBACH et al., 2011a; PÉREZ-JIMÉNEZ, SAURA-CALIXTO, 2006; PINELO et al., 2005). Com base nos resultados de fenólicos totais, foram selecionados os extratos da uva Moscato: semente etanol e

casca acetona/água (7:3). Apenas com estes extratos e o do bagaço da uva Shiraz foram realizadas as demais análises deste trabalho.

Para o cultivar Shiraz foi utilizado um sistema de solvente hidroalcoólico (etanol/água, 8:2). Misturas hidroalcoólicas se mostraram bastante eficientes na extração de antocianinas, que são os principais fenólicos em uvas tintas (ROCKENBACH et al., 2008). O extrato da uva Shiraz apresentou teor de fenólico igual a $133,92 \pm 1,99$ mg EAG/g. Esse resultado é superior ao encontrado recentemente por Lingua e colaboradores (2016b). Em trabalho realizado no Sul da França, com bagaço de 6 cultivares de uva tintas, entre elas a Shiraz, coletadas em diferentes vinícolas apresentaram resultados semelhantes ao deste estudo, apesar de terem trabalhado com casca e semente separados, no trabalho o destaque foi para as cultivares 'Alicante Bouschet' e 'Shiraz', que obtiveram altos teores de fenólicos (KY; TEISSEDRE 2015). Em estudo realizado por Granato e colaboradores (2011), onde foram avaliados 73 vinhos tintos da Argentina, Brasil e Chile, concluíram que os vinhos das cultivares Malbec, Shiraz e Cabernet sauvignon foram os que apresentaram maior teor de fenólicos. Vários outros trabalhos constataram que o bagaço da uva Shiraz apresenta altos teores de fenólicos, principalmente antocianinas (DOWNEY et al., 2004; LINGUA et al., 2016a; GINJOM et al., 2011; GUTIERREZ et al., 2005).

É preciso levar em consideração que a concentração de fenólicos nos subprodutos depende do processo de vinificação bem como das características genéticas e ambientais. (YILMAZ; TOLEDO, 2004; ROCKENBACH, et al., 2011b; JARA-PALACIOS et al., 2014; GARCÍA-LOMILLO, et al., 2014). Os subprodutos gerados após a elaboração de vinhos constituem uma fonte para a extração de compostos bioativos, antioxidantes, os quais podem ser utilizados como suplementos alimentares ou na produção de fitoquímicos, sendo uma fonte relativamente barata destes compostos (ROCKENBACH et al., 2011a; TOALDO et al., 2014).

5.2. Teor de flavonoides, antocianinas e taninos

Os resultados para o teor de flavonoides, antocianinas e taninos dos resíduos da uva Moscato e Shiraz estão apresentados na Tabela 3. No geral, os taninos foram os compostos fenólicos encontrados em maior quantidade nos extratos, com destaque para o extrato etanólico da semente Moscato que apresentou teores de $195,69 \pm 10,43$ mg EC/g de extrato e $133,00 \pm 12,52$ mg EAT/g de extrato de taninos condensados e galotaninos, respectivamente. O extrato hidroacetônico das cascas de Moscato apresentou teor de taninos $24,34 \pm 2,99$ mg EC/g de extrato, essa grande diferença no teor de taninos pode está relacionada ao processo de vinificação, pois durante a produção de vinho a casca é mais afetada no processo de maceração, bem como, tem mais contato com o álcool produzido durante a fermentação o que facilita a extração dessas substâncias na casca (CANALS et al., 2005; DEL LLAUDY et al., 2008; GONZALEZ-MANZANO, RIVAS-GONZALO, 2004). Além disso, estudos comprovaram que as sementes tem maior teor taninos que as casca (LEE, et al., 2008; JENSEN, et al., 2008; GONZALEZ-MANZANO, RIVAS-GONZALO, 2004).

Tabela 3. Teores de flavonoides, antocianinas, taninos condensados e galotaninos

Testes/Amostras	Casca Moscato (acetona/água 7:3)	Semente Moscato (etanol)	Shiraz bagaço (etanol/água 8:2)
Teor de flavonoides (mg EQ/g de extrato)	$4,22 \pm 0,22$	$2,76 \pm 0,27$	$5,82 \pm 0,54$
Teor de Antocianinas (mg EAM/g de extrato)	$0,21 \pm 0,08$	$0,042 \pm 0,00$	$20,19 \pm 0,35$
Teor de taninos condensados (mg EC/g de extrato)	$24,34 \pm 2,99$	$195,69 \pm 10,43$	$32,35 \pm 2,77$
Teor de galotaninos (mg EAT/g de extrato)	$31,88 \pm 4,06$	$133,00 \pm 12,52$	$30,43 \pm 1,22$

Os valores, de taninos condensados, encontrados para os extratos das sementes e cascas da Moscato são semelhantes ao encontrado por Ribeiro (2015), que analisou vários resíduos de duas vinícolas da região do Vale de São Francisco,

entre eles os da uva Moscato canelli, o trabalho relata valores de 5456,94 e 6691,99 mg/g de amostra seca para a semente e 440,62 e 420,65 mg/g de amostra seca para a casca, ao convertemos o nosso resultado para mg/g de amostra seca os extratos têm 8408,79 e 570,77 mg/g de amostra seca, para a semente e casca, respectivamente.

O extrato hidroalcoólico do bagaço da uva Shiraz apresentou o maior teor de flavonoides com $5,82 \pm 0,54$ mg EQ/g de extrato, seguida pela casca e semente da uva Moscato $4,22 \pm 0,22$ e $2,76 \pm 0,27$ mg EQ/g de extrato, respectivamente. Para o teste de antocianinas monoméricas os extratos da variedade Moscato apresentaram teores menores que 1,0 mg EAM/g de extrato, esses valores baixos são esperados para uvas “brancas”, pois as antocianinas são as responsáveis pela coloração avermelhada das uvas tintas. O extrato hidroalcoólico do bagaço da uva Shiraz apresentou $20,19 \pm 0,02$ mg de antocianinas/g de extrato. O alto teor de antocianinas em uva, bagaço e vinho de Shiraz, tem sido comprovado por diversos trabalhos recentemente. Ky e Teissedre (2015) ao estudar seis variedades de uvas tintas concluíram que as cascas da uva Shiraz foram as que apresentaram maior teor de compostos fenólicos, taninos e antocianinas. Em estudo recente com as uvas Barbera D’asti, Cabernet Sauvignon, Malbec, Merlot, Shiraz e Pinot Noir, Casassa e colaboradores (2015) encontraram valores expressivos de fenólicos (2834 ± 12 mg/L GAE, antocianinas (366 ± 9 mg/L) e taninos (1535 ± 62 mg/L) para a uva Shiraz que foi a variedade que apresentou maiores teores destes compostos, entre as uvas testadas.

Vários trabalhos relatam a presença de antocianinas em uvas tintas. Na variedade Shiraz, por exemplo, já foram identificadas a delphinidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo, malvidina-3-glicosídeo, petunidina-acetilglicosídeo, peonidina-acetilglicosídeo, malvidina-acetilglicosídeo, além de peonidina-cumaroilglicosídeo, malvidina-cumaroilglicosídeo (LINGUA et al., 2016a; GINJOM, et al., 2012; LINGUA et al., 2016b).

Muitos trabalhos com resíduos do processamento de uvas apontam esse material como potencial fonte de antioxidantes naturais, tendo em vista que a composição fenólica tal como as antocianinas, flavonóis, flavan-3-óis, proantocianidinas e ácidos fenólicos das uvas, são os principais responsáveis pela

atividade antioxidante (SÁYAGO-AYERDI et al., 2009; HOGAN et al., 2010a; BABBAR et al., 2011; ROCKENBACH et al., 2011a).

A constatação da presença de diversos compostos fenólicos nos bagaços das cultivares Moscato e Shiraz confirma que, esses compostos não são extraídos completamente no processo de vinificação. Desta forma, os bagaços destas uvas surgem como uma fonte de baixo custo para obtenção de compostos fenólicos, com potencial aplicação na indústria cosmética, farmacêutica, alimentos, tintas, entre outras.

5.3. Caracterização química do extrato etanol/água (8:2) do bagaço da uva Shiraz por MALDI-TOF-MS e MS/MS

A análise por MALDI-TOF, do extrato hidroalcoólico do bagaço da uva Shiraz, possibilitou a identificação de 54 substâncias (Tabela 4), que englobam antocianinas monoglicosiladas, diglicosiladas e outras classes de pigmentos derivados de antocianinas, como por exemplo, piranoantocianina. A Figura 20 apresenta o espectro de MALDI-TOF-MS do extrato hidroalcoólico do bagaço da uva Shiraz.

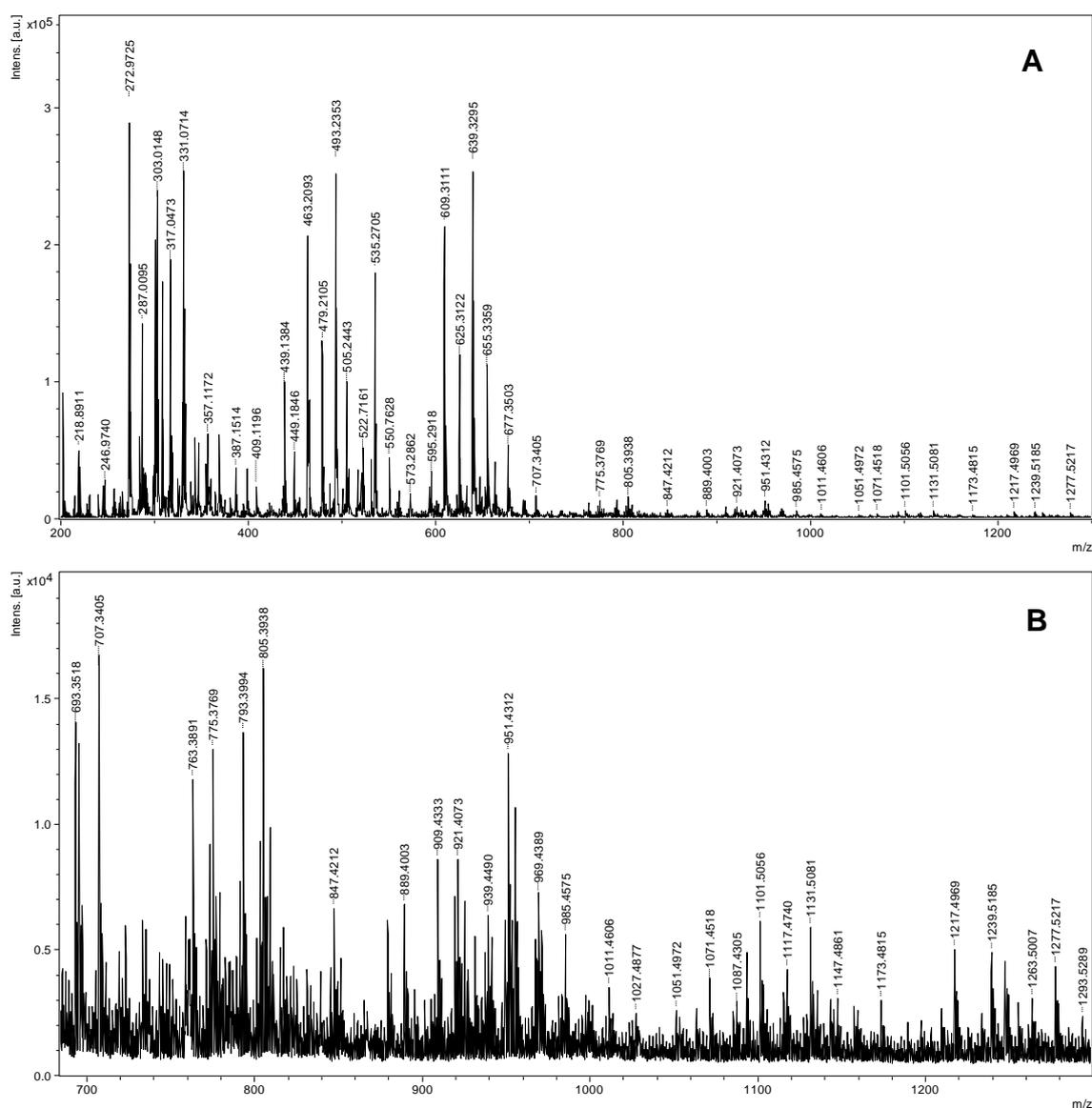


Figura 20. Espectro de MALDI-TOF-MS do extrato hidroalcoólico do bagaço da uva Shiraz (A) e expansão de 700 a 1300 Da (B).

Tabela 4. Proposta de identificação das substâncias presentes no extrato etanol/água (8:2) do bagaço da uva Shiraz. Análise por MALDI-TOF.

	Composto	Íon Molecular (M⁺)/ (M+H)⁺	Fragmentos (m/z)
1	Cianidina	287	*
2	Peonidina	301	*
3	Delfinidina	303	*
4	Petunidina	317	*
5	Malvidina	331	*
6	Cianidina-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glicosídeo	449	287
7	Peonidina-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glicosídeo**	463	301
8	Delfinidina-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glicosídeo	465	303
9	Isoquercetina**	465	303
10	Petunidina-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glicosídeo	479	317
11	Isoramnetina-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glicosídeo**	479	317
12	Malvidina-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glicosídeo**	493	331
13	Piranopeonidina-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glicosídeo	487	325
14	Cianidina-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acetil)-glicosídeo	491	*
15	Peonidina-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acetil)-glicosídeo	505	301
16	Delfinidina-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acetil)-glicosídeo	507	*
17	Petunidina-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acetil)-glicosídeo	521	317
18	Malvidina-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acetil)-glicosídeo	535	331
19	Piranomalvidina-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glicosídeo	517	355
20	Carboxi-piranopeonidina-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glicosídeo	531	369
21	Carboxi-piranopeonidina-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acetil)-glicosídeo	573	369
22	Cianidina-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroil)-glicosídeo	595	287
23	Peonidina-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroil)-glicosídeo**	609	301
24	Delfinidina-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroil)-glicosídeo	611	*
25	Petunidina-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroil)-glicosídeo	625	307
26	Malvidina-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroil)-glicosídeo**	639	331
27	Cianidina-3,5- <i>O</i> -β- <i>D</i> -diglicosídeo	611	449/287
28	Peonidina-3,5- <i>O</i> -β- <i>D</i> -diglicosídeo	625	463/301
29	Delfinidina-3,5- <i>O</i> -β- <i>D</i> -diglicosídeo	627	*
30	Petunidina-3,5- <i>O</i> -β- <i>D</i> -diglicosídeo	641	*
31	Malvidina-3,5- <i>O</i> -β- <i>D</i> -diglicosídeo	655	493/331

*Sem MS/MS

**Substâncias isoladas

Tabela 4. Continuação.

	Composto	Íon Molecular (M⁺)/(M+H)⁺	Fragmentos (m/z)
32	Metil-piranomalvidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaroil)-glicosídeo	677	369
33	Carboxi-piranopetunidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaroil)-glicosídeo	693	385
34	Carboxi-piranopeonidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cafeoil)-glicosídeo	693	369
35	Metil-piranopeonidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaroil)-glicosídeo	647	369
36	Carboxi-piranomalvidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaroil)-glicosídeo	707	399
37	Peonidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaroil)- 5-O- β - <i>D</i> -diglicosídeo	763	609/453/301
38	Não identificado	775	639/491/331
39	Malvidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaroil)- 5-O- β - <i>D</i> -diglicosídeo	793	639/483/331
40	Malvidina-3-O-glicosídeo-4-vinil-(<i>epi</i>)catequina	805	643/491/331
41	Malvidina-3-O-glicosídeo-4-etil-(<i>epi</i>)catequina	809	519/357/331
42	Malvidina-3-(6-O-acetilglicosídeo)-(<i>epi</i>)catequina	847	643/561/357/331
43	Não identificado	879	677/571/419
44	Não identificado	889	581
45	Não identificado	909	601/449
46	Peonidina-3-(6-O- <i>p</i> -cumaroil glicosídeo)-4-vinil-(<i>epi</i>)catequina	921	613/461
47	Peonidina-3-(6-O- <i>p</i> -cumaroil glicosídeo)-4-etil-(<i>epi</i>)catequina	925	635/617/327
48	Malvidina-3-(6-O- <i>p</i> -cumaroil glicosídeo)-4-vinil-(<i>epi</i>)catequina	951	643/491
49	Malvidina-3-(6-O- <i>p</i> -cumaroil glicosídeo)-4-etil-(<i>epi</i>)catequina	955	665/357
50	Não identificado	969	807/661/331
51	Malvidina-3-O- β - <i>D</i> -glicosídeo (dímero)	985	827/661/331
52	Não identificado	1011	849/493/357/331
53	Não identificado	1071	909/763/357
54	Malvidina-3-O-glicosídeo-4-vinil-di(<i>epi</i>)catequina	1093	931/803/641
55	Malvidina-3-O- β - <i>D</i> -glicosídeo-peonidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaroil)-glicosídeo	1101	939/793/631/357

Tabela 4. Continuação

	Composto	Íon Molecular (M ⁺)/(M+H) ⁺	Fragmentos (m/z)
56	Malvidina-3-O-β-D-glicosídeo-petunidina-3-O-(6-O-p-cumaroil)-glicosídeo	1117	955/807/357
57	Malvidina-3-O-β-D-glicosídeo-malvidina-3-O-(6-O-p-cumaroil)-glicosídeo	1131	Não fragmentou
58	Não identificado	1217	Não fragmentou
59	Malvidina-3-(6-O-p-cumaroil glicosídeo)-4-vinil-di(epi)catequina	1239	Não fragmentou
60	Não identificado	1247	Não fragmentou
61	Malvidina-3-O-(6-O-p-cumaroil glicosídeo (dímero))	1277	Não fragmentou

Antocianinas consistem no maior e mais importante grupo de pigmentos naturais solúveis em água, sendo responsáveis por cores que vão desde laranja e vermelho a violeta e azul de diversas flores, frutos e folhas (CAVALCANTI et al., 2011; REYNERTSON et al., 2006). Antocianidinas livres são raramente encontradas na natureza, ocorrendo comumente glicosiladas com açúcares que estabilizam a molécula (FRANCIS, 2000). A glicosilação pode ocorrer em várias posições, sendo observada com maior frequência na posição 3. O segundo açúcar quando presente na molécula encontra-se na posição 5, porém podem ocorrer glicosilações nas posições 7, 3^o, 4^o e 5^o. A glicose é o açúcar mais comumente ligado às antocianidinas presente em uvas, ocorrendo como monoglicosídeos, diglicosídeos e triglicosídeos (FRANCIS, 2000). A metoxilação é mais frequente nas posições 3^o e 5^o e menos comum na 5 e na 7. É importante salientar que antocianina natural nunca apresenta as hidroxilas das posições 5, 7 e 4^o substituídas ao mesmo tempo. Um dos grupos hidroxila deve permanecer livre numa dessas posições para a formação da estrutura quinoidal. Muitas vezes, os açúcares das antocianinas são acilados por ácidos dos quais os mais comumente encontrados são: *p*-cumárico, ferúlico, caféico, *p*-hidroxibenzóico, sinápico, malônico, acético, succínico, oxálico e málico. Os substituintes acila encontram-se usualmente ligados à hidroxila do açúcar na posição 3 e com menor frequência nas posições 4 e 6 (MALACRIDA; MOTTA, 2006)

Os picos dos íons moleculares em *m/z* 449, 463, 465, 479 e 493 correspondem a cianidina-3-O-β-D-glicosídeo, peonidina-3-O-β-D-glicosídeo,

delfinidina-3-*O*- β -*D*-glicosídeo, petunidina-3-*O*- β -*D*-glicosídeo e malvidina-3-*O*- β -*D*-glicosídeo, respectivamente. O íon em m/z 479 também foi atribuído ao flavonoide isoquercetina que foi isolado neste trabalho (elucidação estrutural tópico 5.4.). Como o cátion flavílico é muito estável e não possui sítio de fácil ruptura da ligação, os espectros das antocianinas apresentam um pico do íon molecular $[M^+]$. As antocianinas normalmente são *O*-glicosiladas, portanto a fragmentação dessas antocianinas *O*-glicosiladas envolve a clivagem da ligação glicosídica acompanhada por transferência de próton envolvendo a perda do glicosídeo e resultando em íons que contêm somente a aglicona $[M^+-162]$ (Figura 21-25) (OLIVEIRA, et al., 2001; VIVAR-QUINTANA et al 2002; ALCALDE-EON et al 2004; DE VILLERS et al., 2004; CHINNICI et al., 2009).

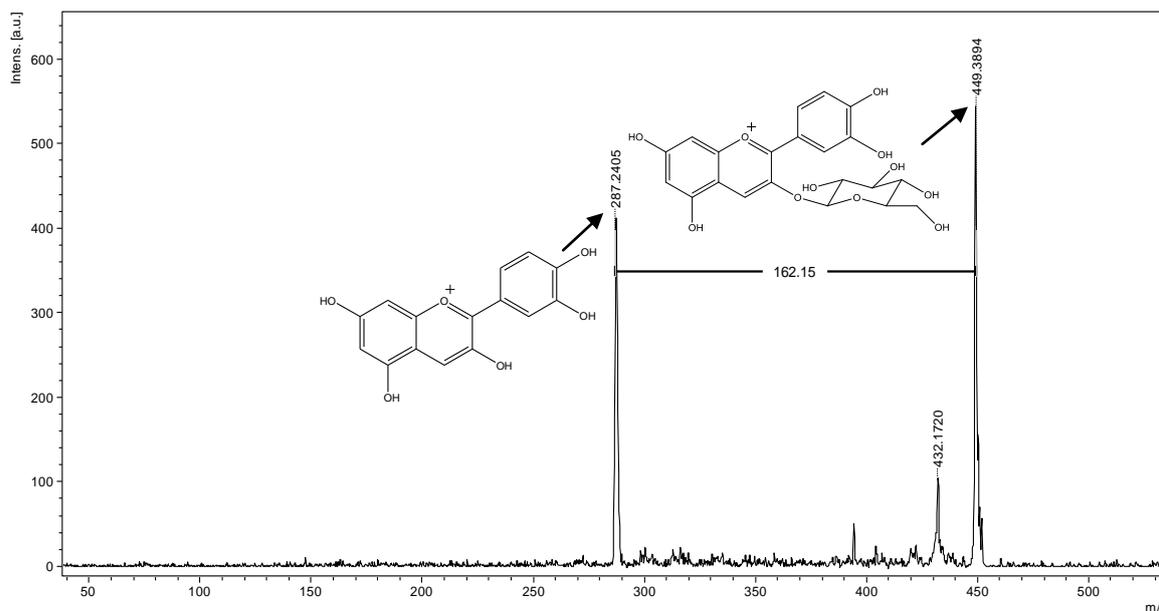


Figura 21. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon m/z 449 - cianidina-3-*O*- β -*D*-glicosídeo.

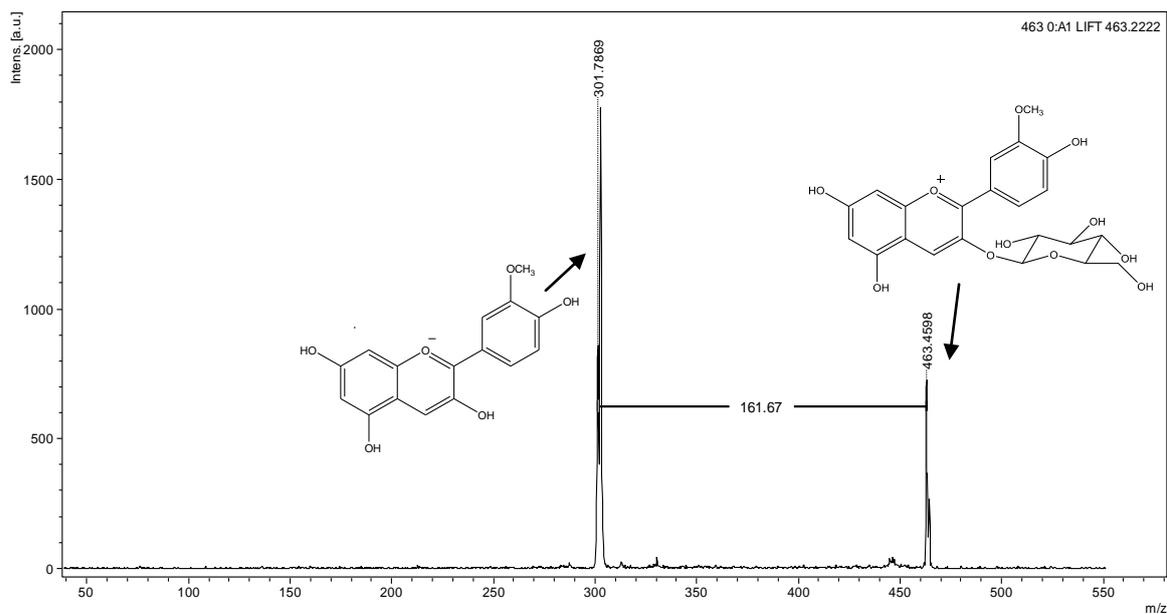


Figura 22. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon m/z 463 - peonidina-3-O- β -D-glicosídeo.

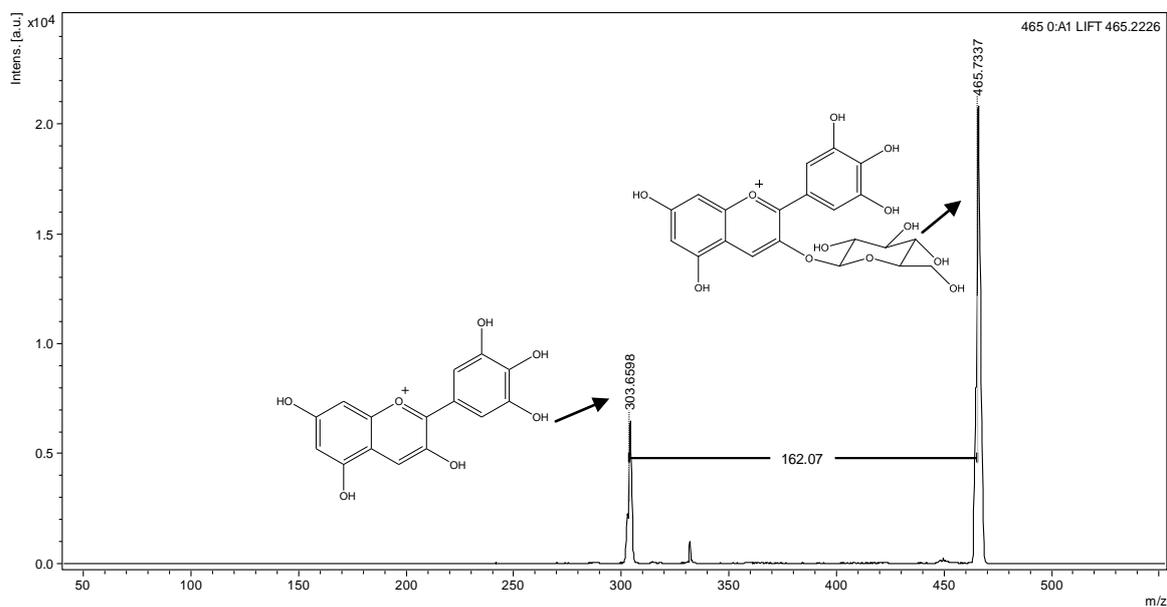


Figura 23. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon m/z 465 - delphinidina-3-O- β -D-glicosídeo.

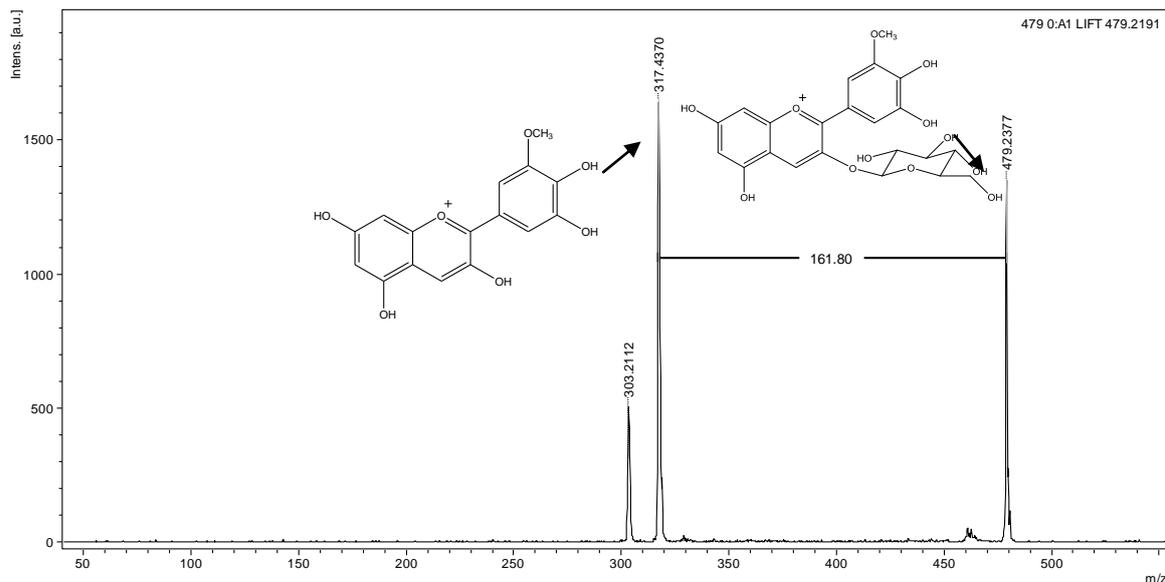


Figura 24. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon m/z 479 - petunidina-3-O- β -D-glicosídeo.

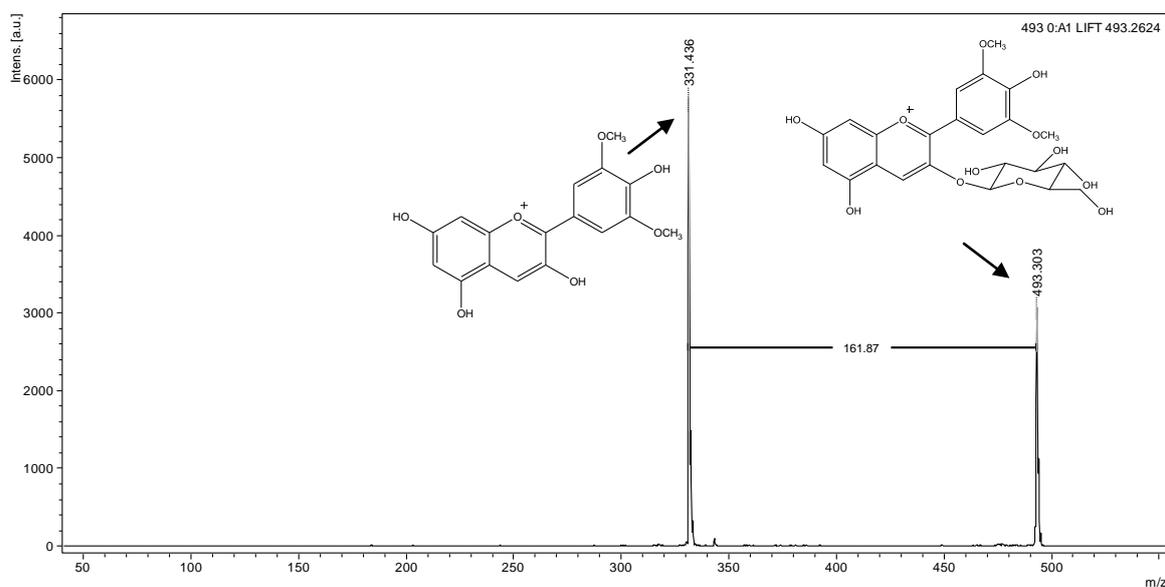


Figura 25. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon m/z 493 - malvidina-3-O- β -D-glicosídeo.

As antocianinas cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina identificadas na forma de agliconas e glicosiladas também foram identificadas na forma dos derivados, 3-O-(6-O-acetil)-glicosídeo e 3-O-(6-O-*p*-cumaroil)-glicosídeo. Os espectros de massas dos derivados 3-O-(6-O-acetil)-glicosídeo são caracterizados pela presença do íon molecular $[M^+]$ e o fragmento $[M^+-204]$, o fragmento 204 Da corresponde ao grupo acetilglicosídeo. Foram atribuídos os picos dos íons moleculares em m/z 491, 505, 507, 521 e 535 a cianidina-3-O-(6-O-acetil)-glicosídeo, peonidina-3-O-(6-O-acetil)-glicosídeo, delphinidina-3-O-(6-O-acetil)-glicosídeo, petunidina-3-O-(6-O-acetil)-glicosídeo e malvidina-3-O-(6-O-acetil)-glicosídeo, respectivamente. As figuras 26 e 27 apresentam os espectros de massas (MS/MS) do íon m/z 505 e 507 e o do íon m/z 535, respectivamente.

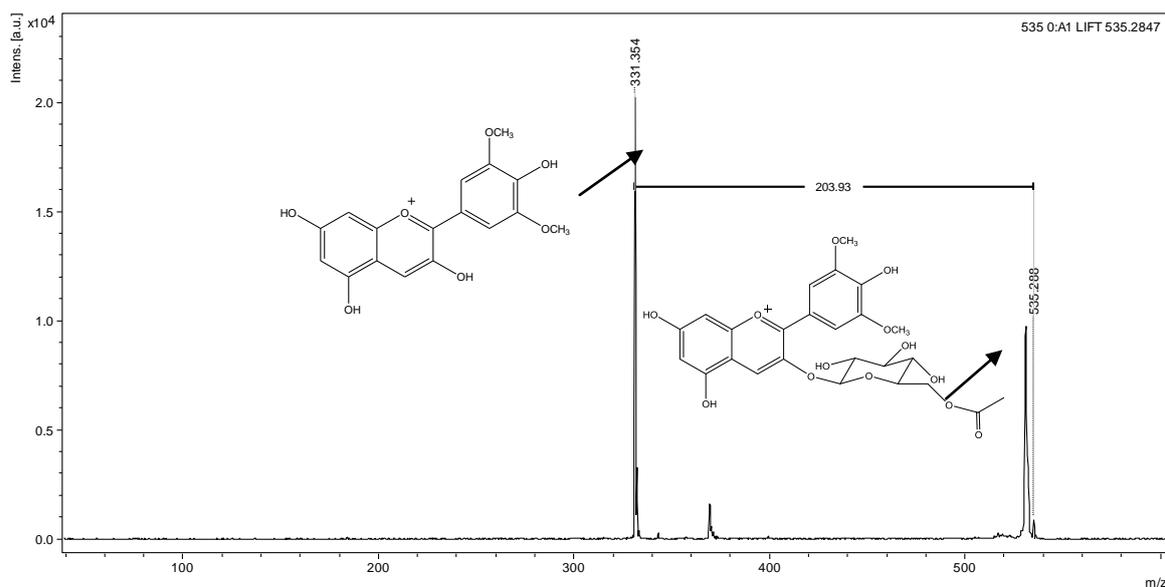


Figura 26. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon m/z 535 - malvidina-3-O-(6-O-acetil)-glicosídeo.

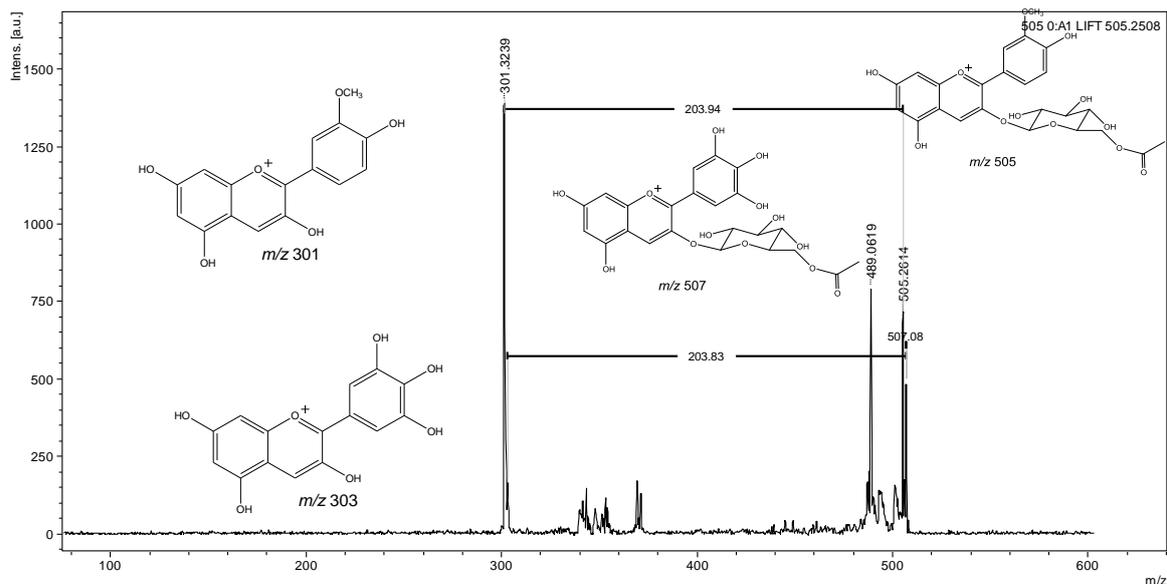


Figura 27. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon m/z 505 e 507 - peonidina-3-O-(6-O-acetil)-glicosídeo, delphinidina-3-O-(6-O-acetil)-glicosídeo, respectivamente.

Analogamente ocorre nos espectros dos derivados 3-O-(6-O-*p*-cumaroil)-glicosídeo, no qual são observados dois sinais, o do íon molecular $[M^+]$ e o fragmento $[M^+-308]$ atribuído à perda do grupo *p*-cumaroil glicosídeo. Foi atribuído a esses derivados os picos m/z 595, 609, 611, 625 e 639 Da que correspondem a cianidina-3-O-(6-O-*p*-cumaroil)-glicosídeo, peonidina-3-O-(6-O-*p*-cumaroil)-glicosídeo, delphinidina-3-O-(6-O-*p*-cumaroil)-glicosídeo, petunidina-3-O-(6-O-*p*-cumaroil)-glicosídeo e malvidina-3-O-(6-O-*p*-cumaroil)-glicosídeo, respectivamente. As estruturas e os espectros (MALDI-MS/MS) estão nas Figuras 28 e 29-33, respectivamente.

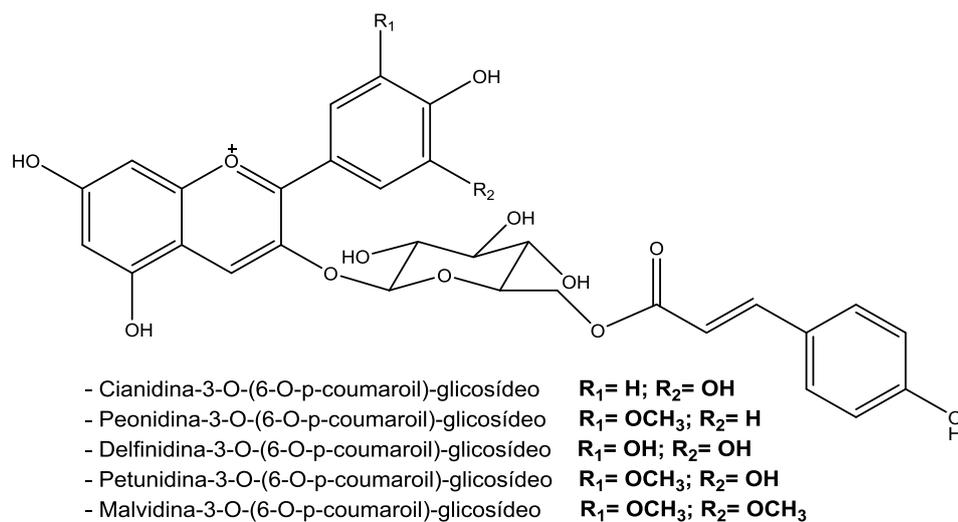


Figura 28. Estruturas das antocianinas-3-O-(6-O-*p*-coumaroil)-glicosídeo identificadas por massas (MALDI-TOF).

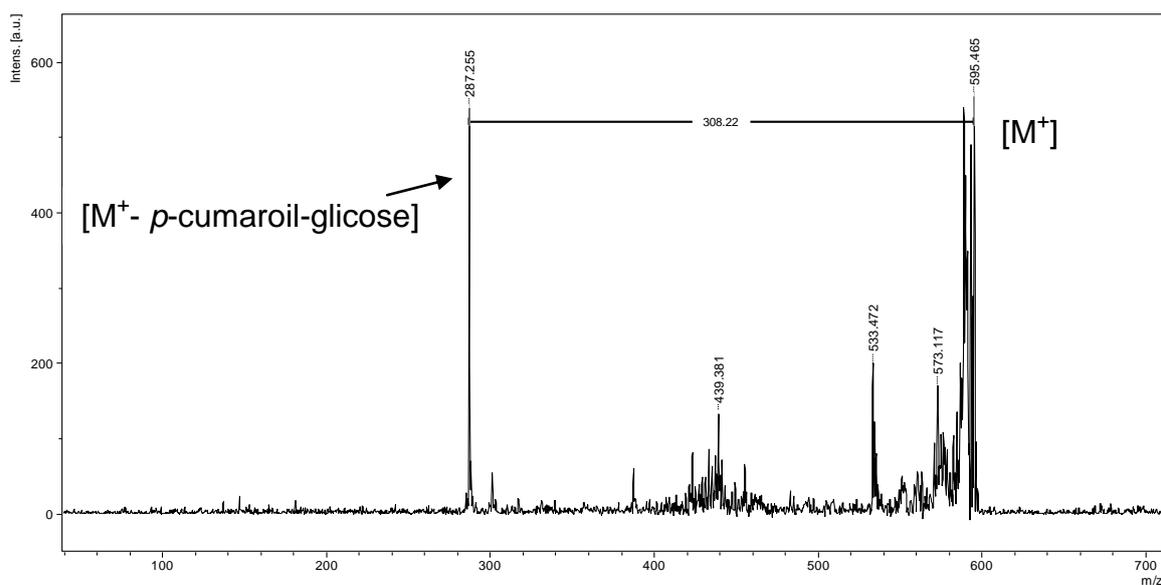


Figura 29. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon m/z 595 - cianidina-3-O-(6-O-*p*-coumaroil)-glicosídeo.

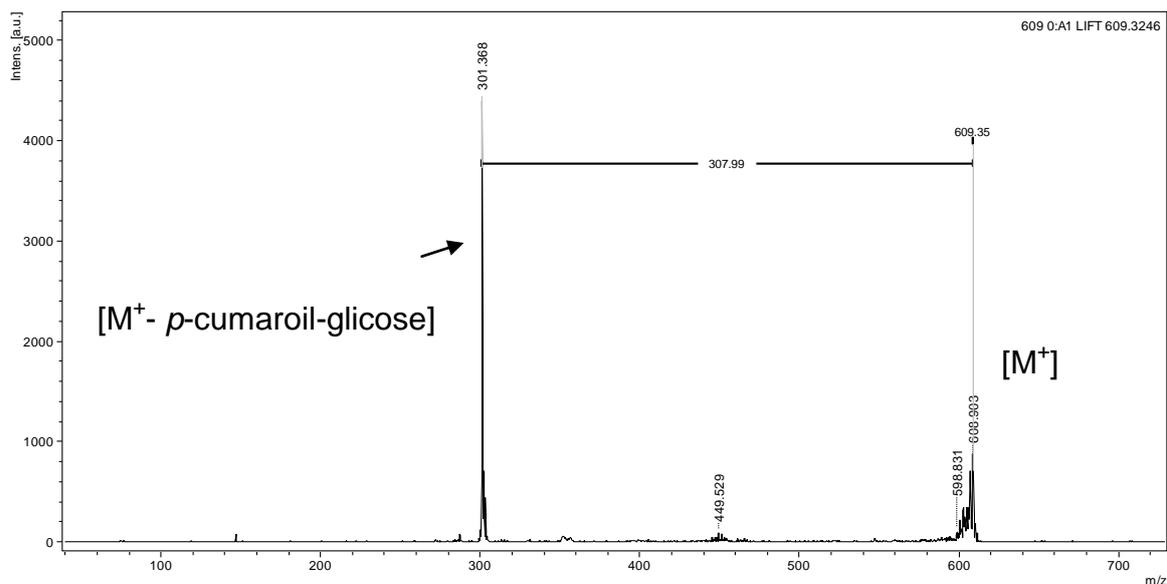


Figura 30. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon m/z 609 - peonidina-3-O-(6-O-*p*-cumaroyl)-glicosídeo.

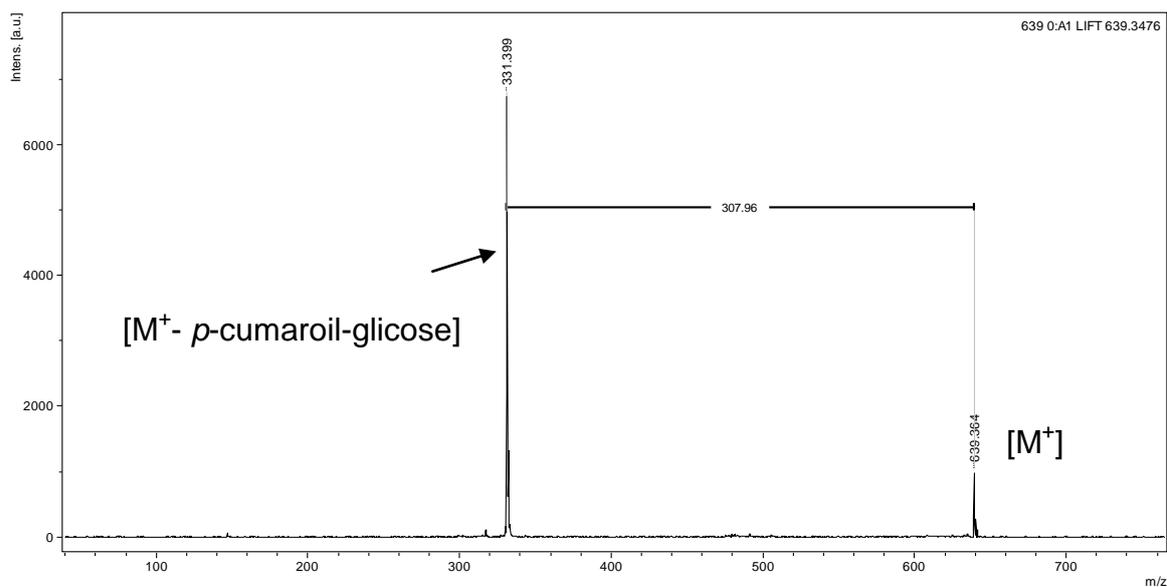


Figura 31. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon m/z 639 - malvidina-3-O-(6-O-*p*-cumaroyl)-glicosídeo.

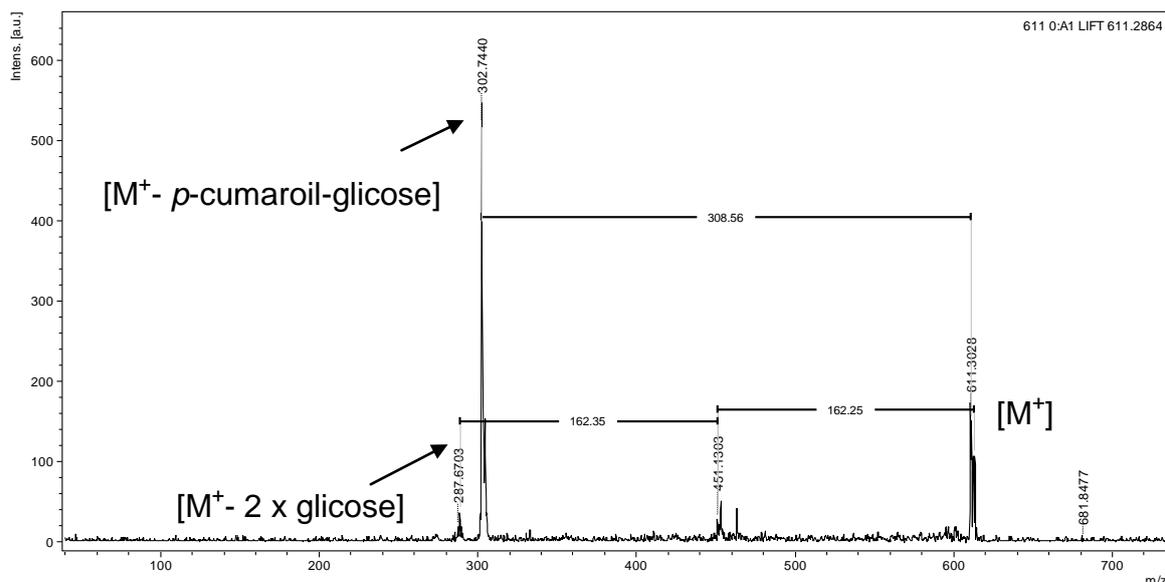


Figura 32. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon m/z 611 - delphinidina-3-O-(6-O-*p*-cumaroyl)-glicosídeo.

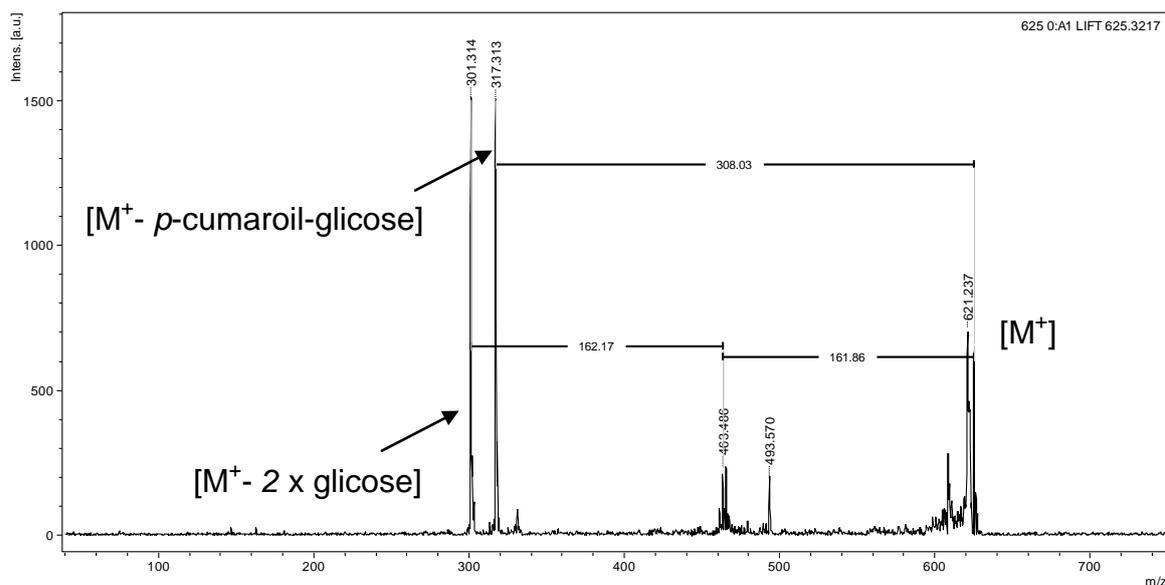


Figura 33. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon m/z 625 - petunidina-3-O-(6-O-*p*-cumaroyl)-glicosídeo.

Os picos com m/z 611 e 625 Da, foram atribuídos também a antocianinas diglicosiladas, é possível observar no espectro de massas (Figuras 32 e 33) os fragmentos $[M^+ - 308]$, característico da eliminação do grupo *p*-cumaroyl-glicosídeo e fragmentos em $[M^+ - 162]$ e $[M^+ - 162 - 162]$ que correspondem à eliminação de duas

glicoses, característico de antocianinas diglicosiladas. Este padrão indica que as antocianinas são glicosiladas nas posições 3 e 5, pois quando submetidas à MS/MS, as antocianinas 3,5-diglicosiladas apresentam duas perdas de unidades glicosídicas, sendo a primeira perda referente ao glicosídeo ligado ao C3 e a segunda ao glicosídeo ligado ao C5. As antocianinas diglicosiladas apenas no C3, com exceção do rutinosídeo, apresentam apenas a perda de um fragmento referente às duas unidades de açúcar ligadas entre si. (WU; PRIOR, 2005a; WU; PRIOR, 2005b; OLIVEIRA et al., 2001). O íon 611 e 625 foram atribuídos a cianidina-3,5-*O*- β -*D*-diglicosídeo e peonidina-3,5-*O*- β -*D*-diglicosídeo, respectivamente. Além dessas duas antocianinas diglicosiladas também foram identificadas a delphinidina-3,5-*O*- β -*D*-diglicosídeo (627 [M⁺]), petunidina-3,5-*O*- β -*D*-diglicosídeo (641 [M⁺]) e a malvidina-3,5-*O*- β -*D*-diglicosídeo (655 [M⁺]), não foram obtidos os espectros MS/MS dessas substâncias. As estruturas das antocianinas diglicosiladas identificadas estão apresentadas na Figura 34.

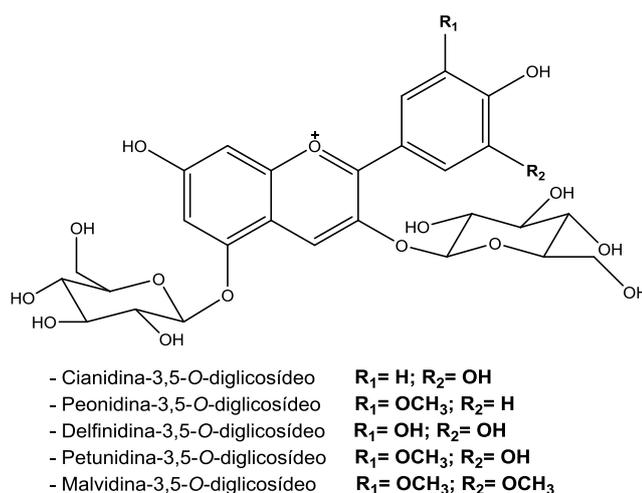
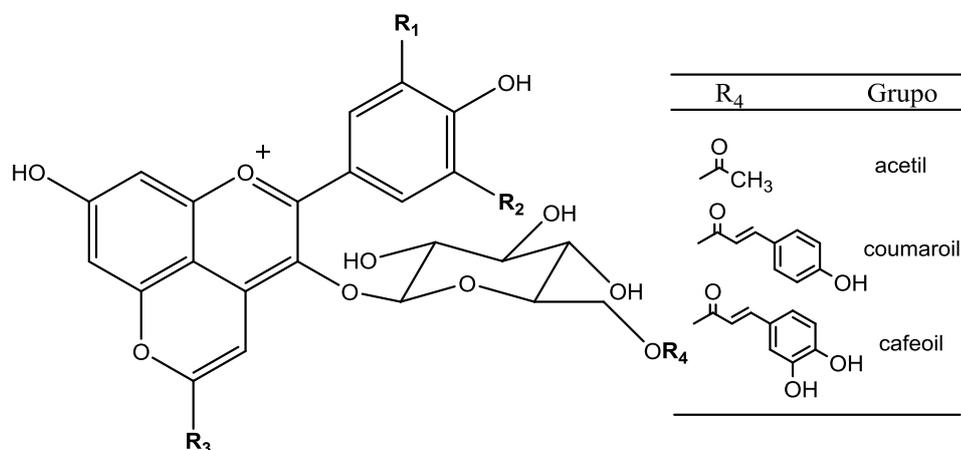


Figura 34. Estruturas das antocianinas-3,5-*O*- β -*D*-diglicosídeo identificadas por MALDI-MS e MS/MS, no extrato hidroalcoólico do bagaço da uva Shiraz.

A análise por MALDI-MS e MS/MS ainda possibilitou a identificação de outras antocianinas mais complexas, como as piranoantocianinas, carboxi-piranoantocianinas, metil- piranoantocianinas e flavanil- piranoantocianinas. As estruturas das piranoantocianinas que foram identificadas estão representadas na

Figura 35 e os espectros de massas (MS/MS) estão apresentados nas Figuras 36-39.



- $m/z = 487$** - R₁= OCH₃; R₂= H; R₃= H; R₄= H
 $m/z = 489$ - R₁= OH; R₂= OH; R₃= H; R₄= H
 $m/z = 517$ - R₁= OCH₃; R₂= OCH₃; R₃= H; R₄= H
 $m/z = 531$ - R₁= OCH₃; R₂= H; R₃= COOH; R₄= H
 $m/z = 573$ - R₁= OCH₃; R₂= H; R₃= COOH; R₄= grupo acetil
 $m/z = 647$ - R₁= OCH₃; R₂= H; R₃= CH₃; R₄= grupo coumaroil
 $m/z = 677$ - R₁= OCH₃; R₂= OCH₃; R₃= CH₃; R₄= grupo coumaroil
 $m/z = 693$ - R₁= OCH₃; R₂= OH; R₃= COOH; R₄= grupo coumaroil
 $m/z = 693$ - R₁= OCH₃; R₂= H; R₃= COOH; R₄= grupo cafeoil
 $m/z = 707$ - R₁= OCH₃; R₂= OCH₃; R₃= COOH; R₄= grupo coumaroil

Figura 35. Estruturas das piranoantocianinas identificadas por MALDI-MS e MS/MS, no extrato hidroalcoólico do bagaço da uva Shiraz.

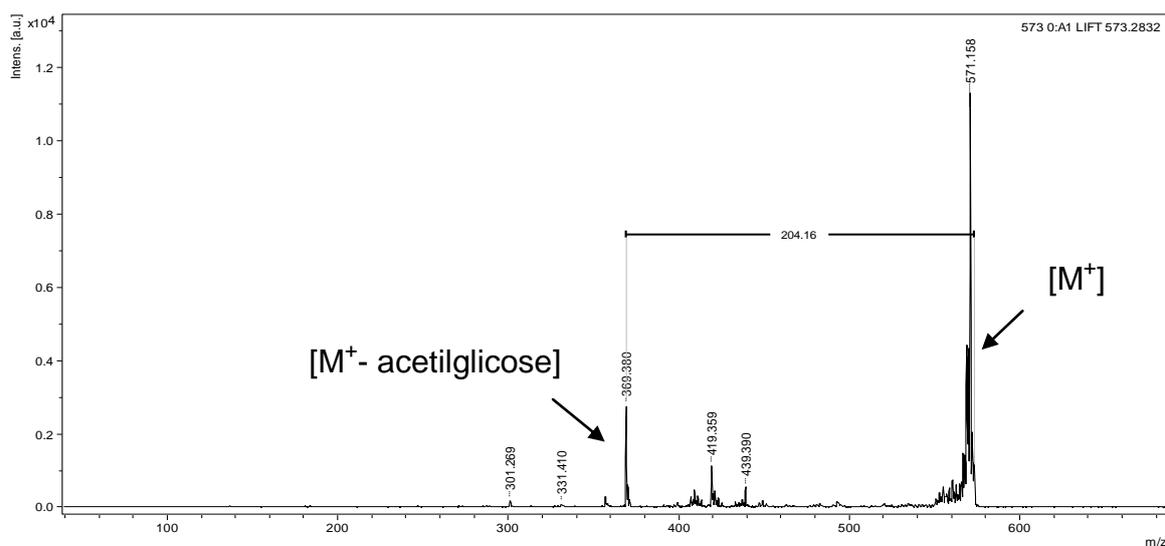


Figura 36. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon m/z 573, que correspondem a carboxi-piranopeonidina-3-O-(6-O-acetil)-glicosídeo.

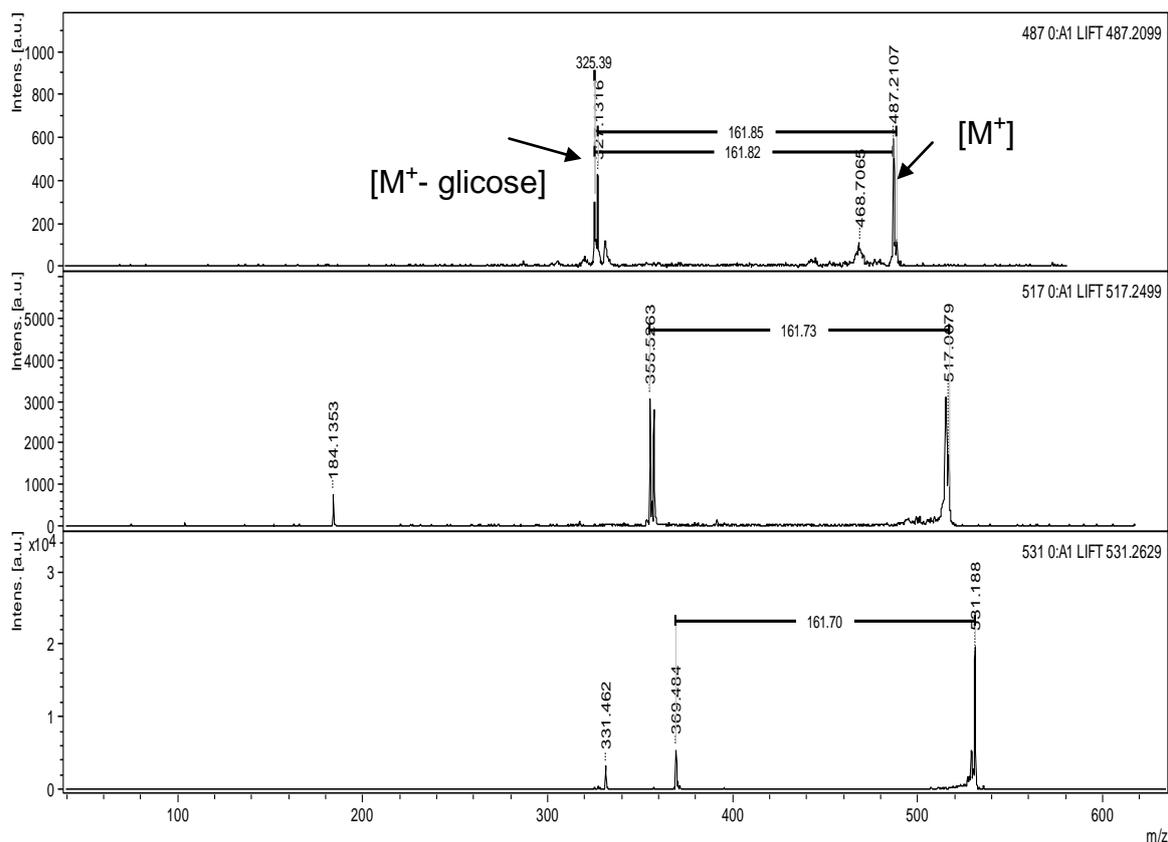


Figura 37. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) dos íons m/z 487/489, 517 e 531, que correspondem a piranopeonidina-3- O - β - D -glicosídeo, piranodelfinidina-3- O - β - D -glicosídeo, piranomalvidina-3- O - β - D -glicosídeo e carboxi-piranopeonidina-3- O - β - D -glicosídeo, respectivamente.

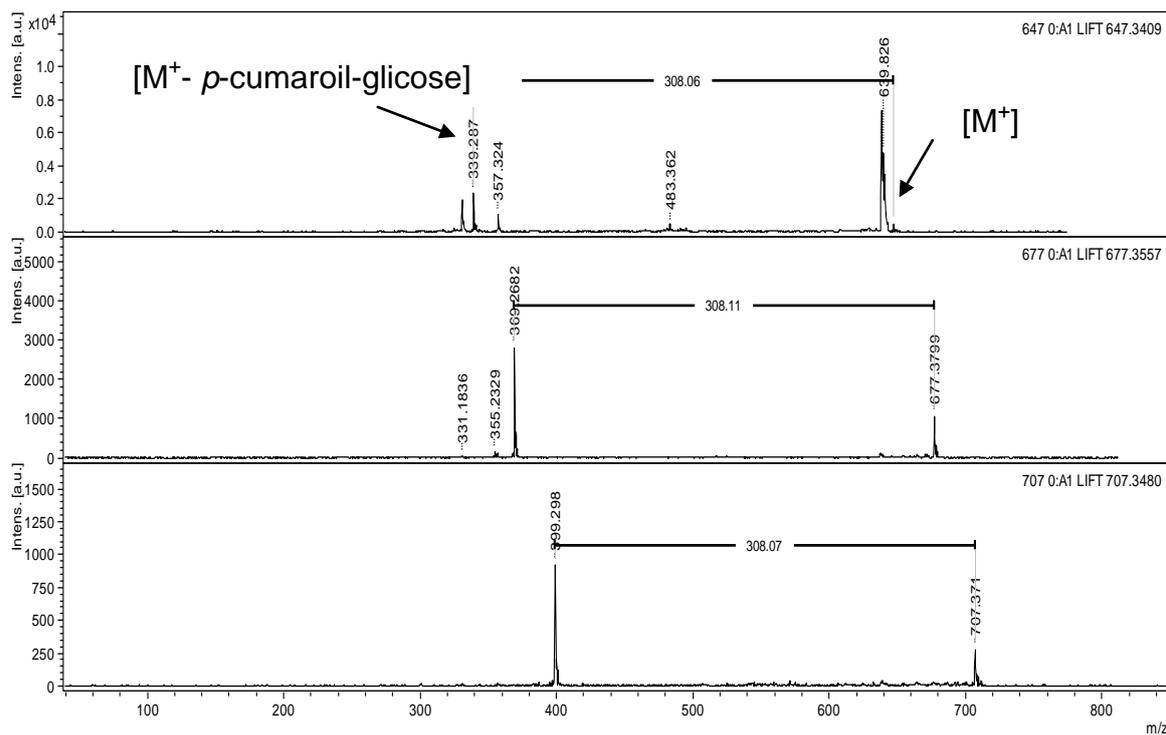


Figura 38. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) dos íons m/z 647, 677 e 707, que correspondem a metil-piranopeonidina-3-O-(6-O-*p*-cumaroil)-glicosídeo, metil-piranomalvidina-3-O-(6-O-*p*-cumaroil)-glicosídeo e carboxi-piranomalvidina-3-O-(6-O-*p*-cumaroil)-glicosídeo, respectivamente.

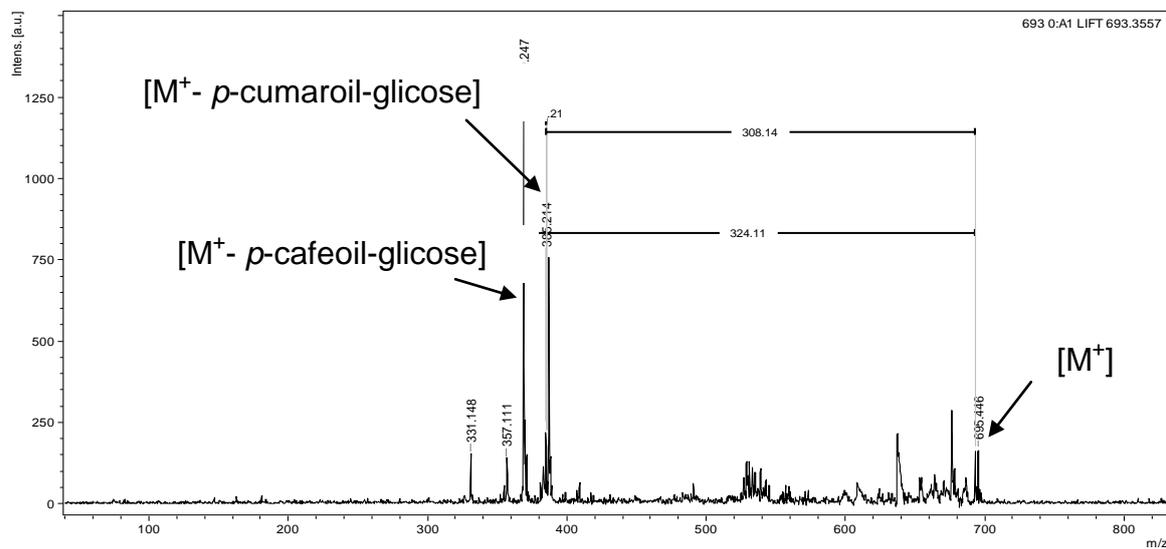


Figura 39. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon m/z 693 que corresponde a carboxi-piranopetunidina-3-O-(6-O-*p*-cumaroil)-glicosídeo $[M^+ - 308]$ e carboxi-piranopeonidina-3-O-(6-O-*p*-cafeoil)-glicosídeo $[M^+ - 324]$.

As piranoantocianidinas têm um anel de pirano adicional entre a posição C4 no anel C e o grupo hidroxila na posição C5 no anel A da molécula do cátion flavílico com moléculas de baixo peso molecular, tais como acetaldeído, ácido pirúvico e vinilfenóis podem levar à formação de outro grupo de pigmentos estáveis, as piranoantocianinas (CASTANEDA-OVANDO et al., 2009; JORDHEIM et al., 2006; DE FREITAS; MATEUS, 2011; FULCRAND et al., 1998; CANALS et al., 2005; BAKKER; TIMBERLAKE, 1997; SCHWARZ et al., 2003; RENTZSCH et al., 2007). Geralmente, as piranoantocianinas constituem uma das mais importantes classes de pigmentos derivados de antocianinas que ocorrem naturalmente no vinho tinto (MATEUS et al., 2001; HAYASAKA; ASENSTORFER, 2002; ALCALDE-EON et al., 2004).

Um número, relativamente, grande de piranoantocianinas foi identificado em uvas e vinhos tintos, especialmente nos vinhos tintos envelhecidos, esses estudos incluem carboxi-piranoantocianinas (vitisinas tipo A), piranoantocianinas (vitisinas tipo B), metil-piranoantocianinas, hidroxifenil-piranoantocianinas (pinotinas), flavanil-piranoantocianinas, dímeros e outros derivados piranoantocianinas (VIDAL et al., 2004; PISSARRA et al., 2004; SUN et al., 2006; JEFFERY et al., 2008; VERGARA et al., 2010; MAZZUCA et al., 2005; IVANOVA et al., 2011; GÓMEZ-ARIZA et al., 2006; FERRARI et al., 2011; NAVE et al., 2010).

Para a formação de vitisina A, sob condições ácidas, tais como existe em vinhos tintos, o ácido pirúvico na sua forma enólica reage com a antocianina, por exemplo, a malvidina-3-O-glicosídeo no grupo hidroxila (nucleófilo) do C5 e o C4 (eletrófilo) para formar o anel pirano adicional. Este passo é seguido por desidratação e re-aromatização para produzir o aduto pirúvico vitisina A (Figura 40) (MORATA et al., 2007; DE FREITAS; MATEUS, 2011; FEI et al., 2012). A formação da vitisina tipo B é análoga à vitisina A, no entanto a reação ocorre entre a antocianina e o acetaldeído (MORATA et al., 2007; FEI et al., 2012).

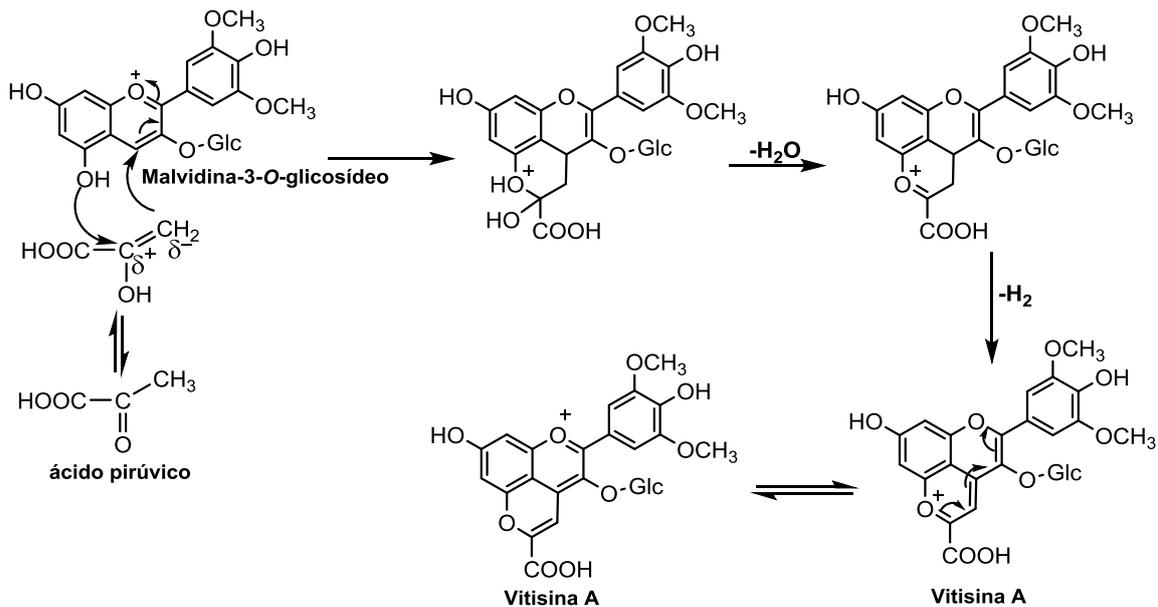


Figura 40. Mecanismo de Formação da Vitisina A. Fonte: DE FREITAS; MATEUS, 2011; FEI et al., 2012.

Outro derivado de antocianinas encontrado no extrato do bagaço da uva Shiraz, foram os flavanil-piranocianidinas que, são formados pela reação de cicloadição entre vinilflavanóis e antocianinas (GÓMEZ-ARIZA et al., 2006; CRUZ et al., 2008). Foram identificados 10 pigmentos desse tipo, suas estruturas e os espectros de massas (MALDI-MS/MS) estão representadas na Figura 41 e 42-45, respectivamente.

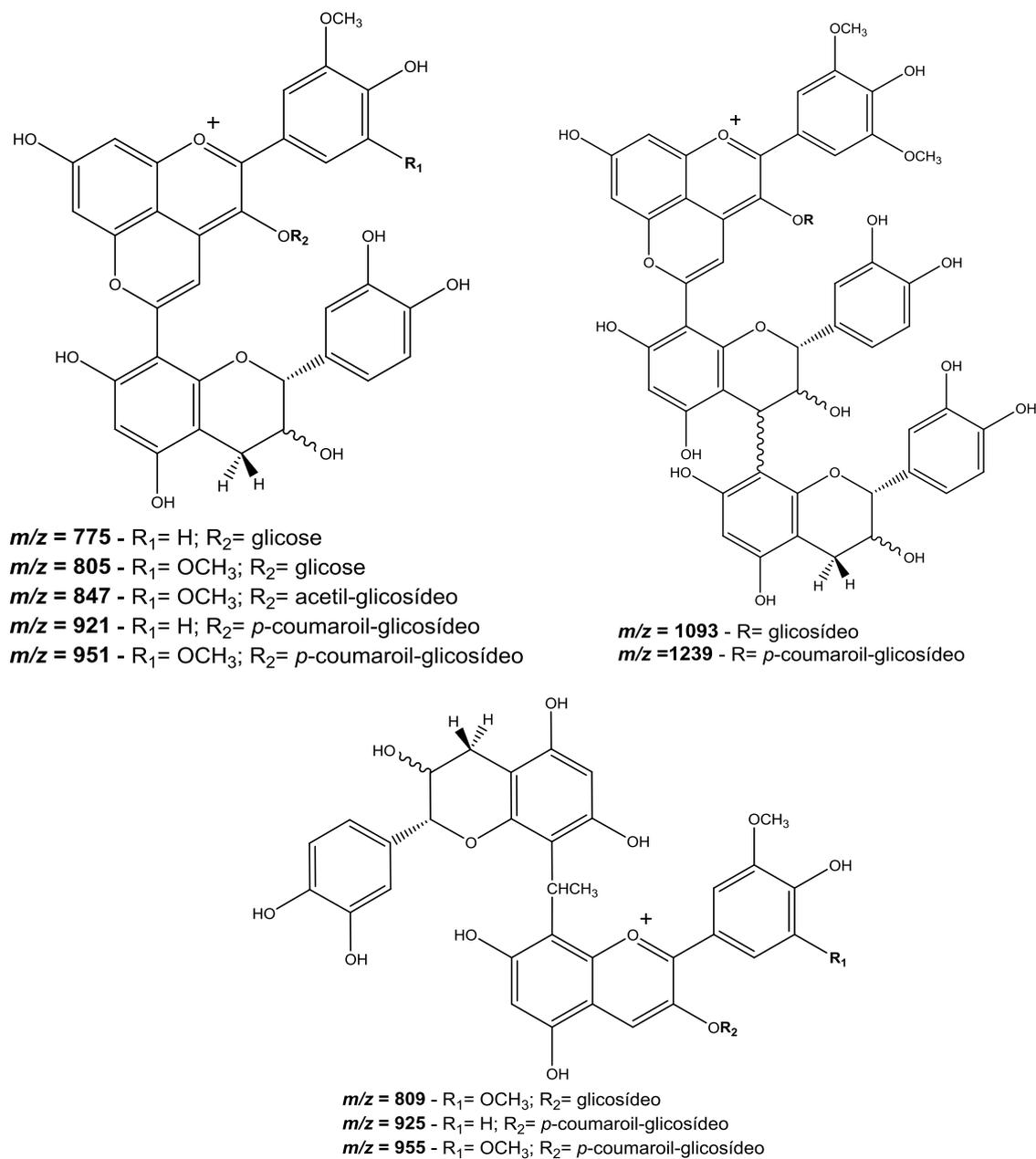


Figura 41. Estruturas das flavanil-piranoantocianinas identificadas por espectro de massas (MALDI-MS e MS/MS).

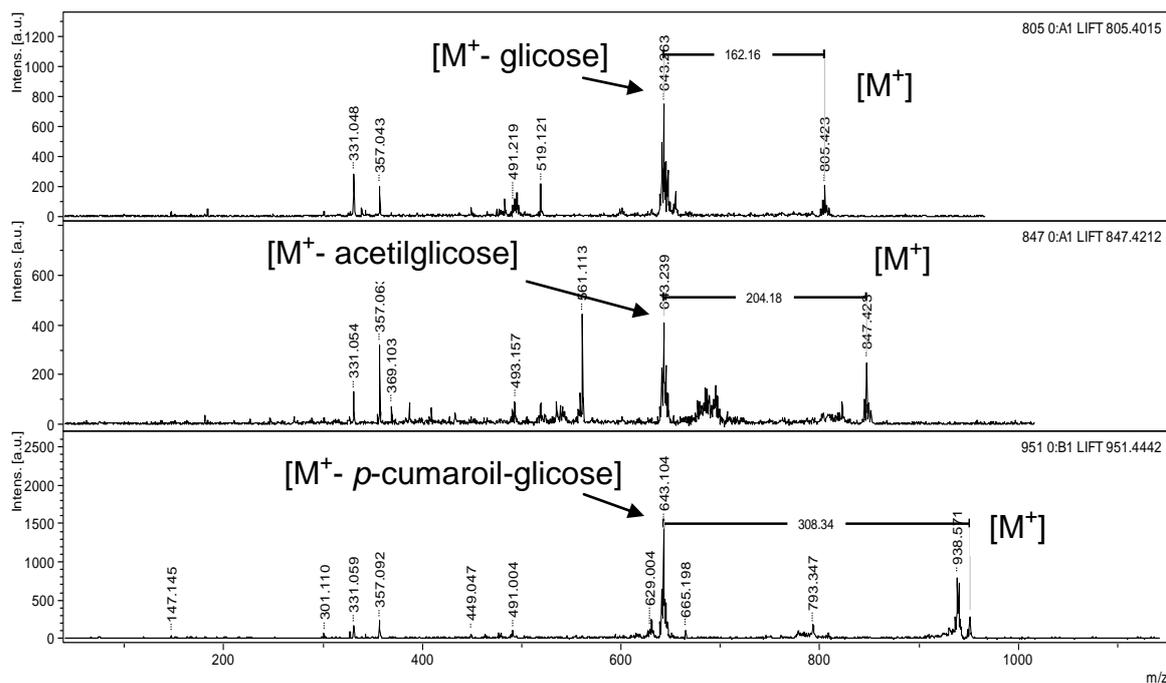


Figura 42. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon m/z 805, 847 e 951.

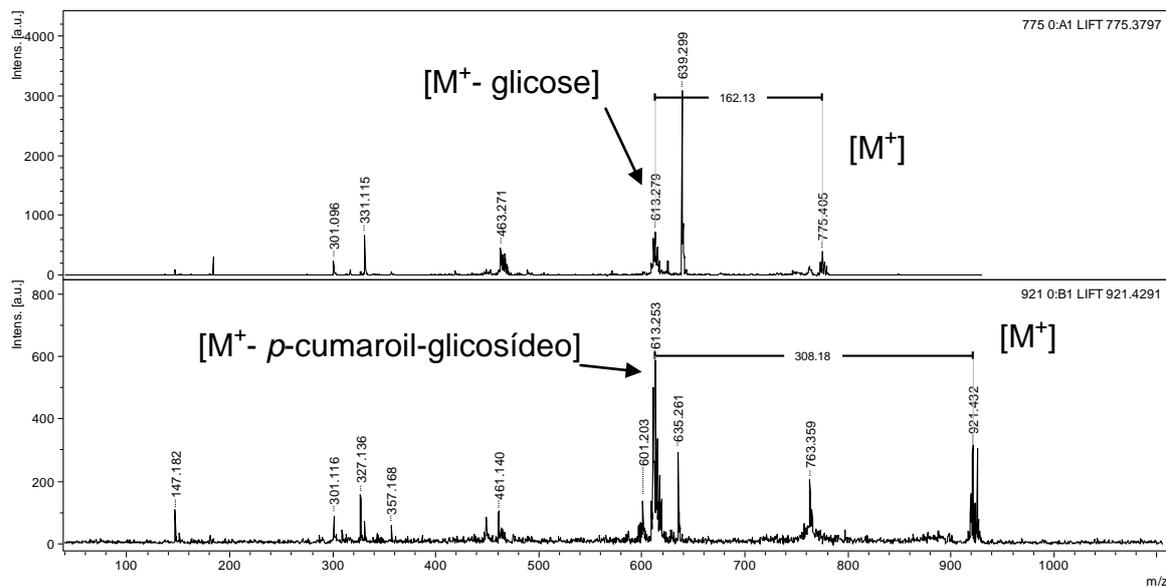


Figura 43. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon m/z 775 e 921.

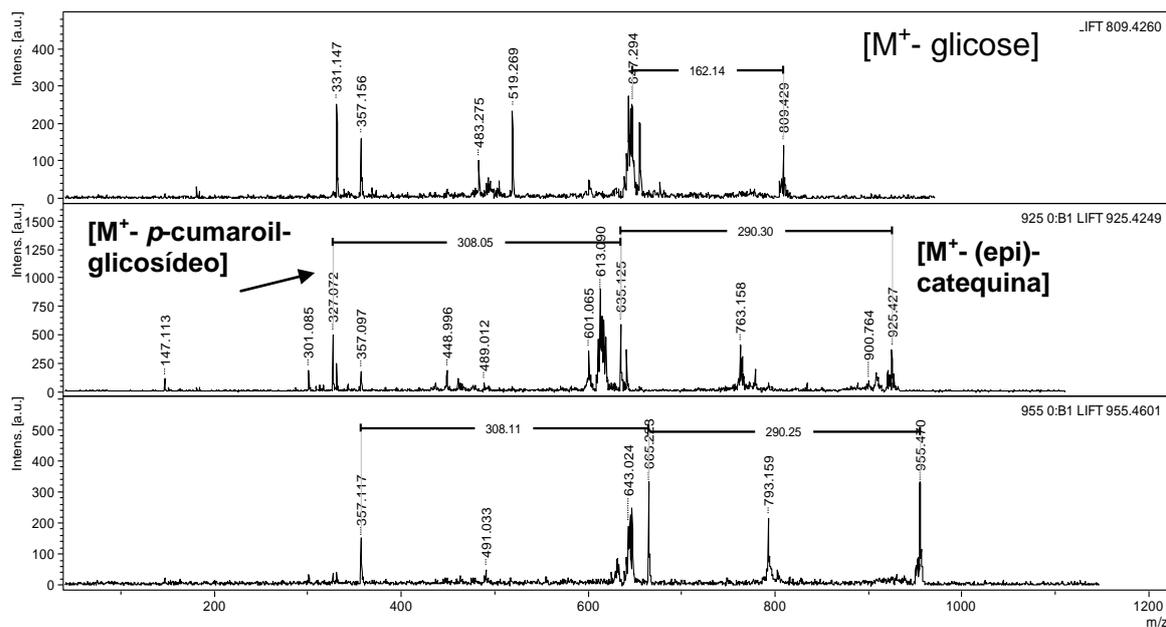


Figura 44. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon m/z 809, 925 e 955. A perda de 290 Da corresponde a (epi) catequina.

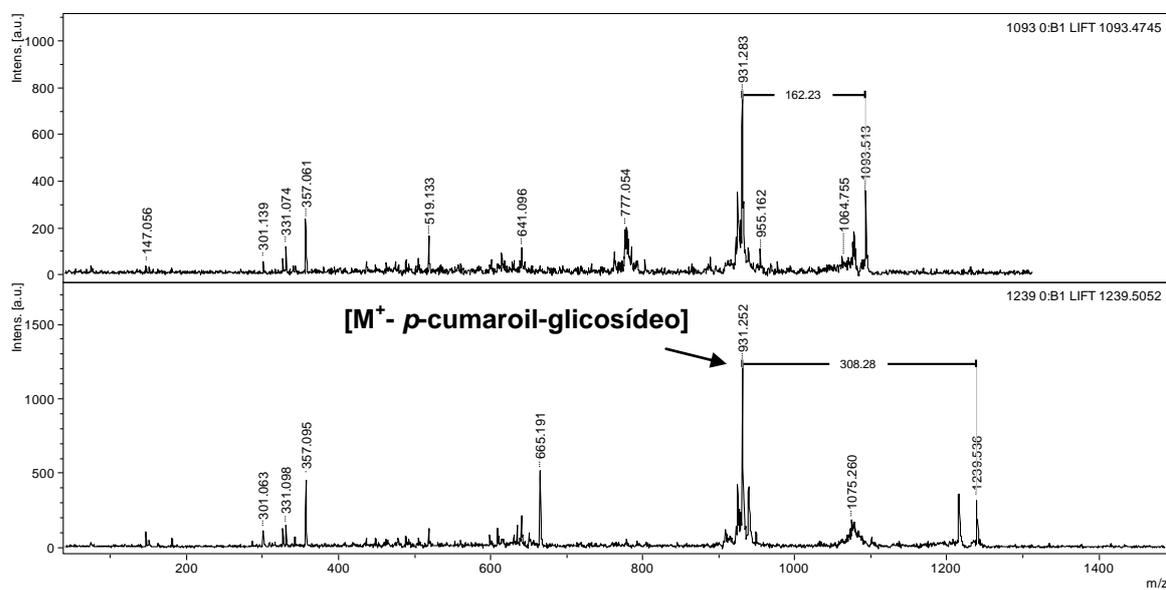


Figura 45. Espectro de massas (MALDI-MS/MS) do íon m/z 1093 e 1239. A perda de 290 Da corresponde a (epi) catequina.

5.4. Isolamento e identificação das principais antocianinas presentes no resíduo da uva Shiraz coletada na região do Vale do São Francisco

Para o isolamento das principais antocianinas presentes no resíduo da uva Shiraz, foi utilizado o extrato acetona/TFA 0,1% (7:3). As antocianinas foram isoladas e identificadas utilizando técnica de CLAE-DAD preparativo. A identificação estrutural foi realizada com base nos dados obtidos por técnicas espectroscópicas de UV, RMN de ^1H e ^{13}C , ESI-MS e MALDI-TOF. A discussão relativa à elucidação estrutural de tais substâncias foi conduzida independente da ordem de obtenção das mesmas.

A substância **SH-1** foi obtida como um sólido vermelho. A revelação com amônia (NH_3) em CCDa indicou se tratar de uma antocianina. O espectro de ultravioleta (UV-vis), obtido por CLAE-DAD (Figura 46), confirmou se tratar de uma antocianina, pois apresentou duas bandas em 274nm e 520nm, características de antocianinas (MACZ-POP et al., 2006; ALCALDE-EON et al., 2004). O espectro de ESI-MS (Figura 47) apresentou um pico de m/z 493 [M^+] e outro de menor intensidade em m/z 463 [M^+]. O MS/MS do pico 493 resultou em uma fragmentação com m/z 331, que corresponde à perda de uma unidade de glicose [$\text{M}^+ - 162$]. O mesmo foi observado para o pico 463, que resultou em uma fragmentação em m/z 301 [$\text{M}-162$] $^+$. Como os picos apresentaram fragmentações diferentes, podemos concluir que **SH-1** trata-se de uma mistura de duas antocianinas. As massas obtidas coincidem com as massas das antocianinas malvidina-3-*O*- β -*D*-glicosídeo e peonidina-3-*O*- β -*D*-glicosídeo, respectivamente, que foram identificadas no extrato hidroalcoólico do bagaço da uva Shiraz, por análise do espectro de massas (MALDI-TOF).

O espectro de APT (Figura 48) mostrou sinais na região entre 100 e 60 ppm que foram atribuídos a presença de unidades de açúcares, o sinal de carbono metínico em 127,88 ppm foi atribuído ao carbono 4, o que confirma que **SH-1** trata-se de antocianina. A duplicidade de alguns sinais corrobora com os dados de massas, confirmando se tratar de uma mistura de antocianinas. Os sinais em 147,46 e 114,89 ppm foram atribuídos aos carbonos 5' da malvidina-3-*O*- β -*D*-glicosídeo e peonidina-3-*O*- β -*D*-glicosídeo, respectivamente. Os sinais em δ_{C} 56,02 e 55,61

confirmam a presença de grupos metoxila na molécula. Os dados de RMN de APT estão na Tabela 5.

Comparando os dados obtidos por ESI-MS, MALDI-TOF, RMN e dados da literatura (LEE et al., 2009; FERNANDES et al., 2015; DELAZAR et al., 2010), foi possível identificar **SH-1** como sendo as antocianinas malvidina-3-*O*- β -*D*-glicosídeo e peonidina-3-*O*- β -*D*-glicosídeo. Essas antocianinas também foram identificadas, no extrato hidroalcoólico do bagaço da uva Shiraz, por análise de MALDI-TOF.

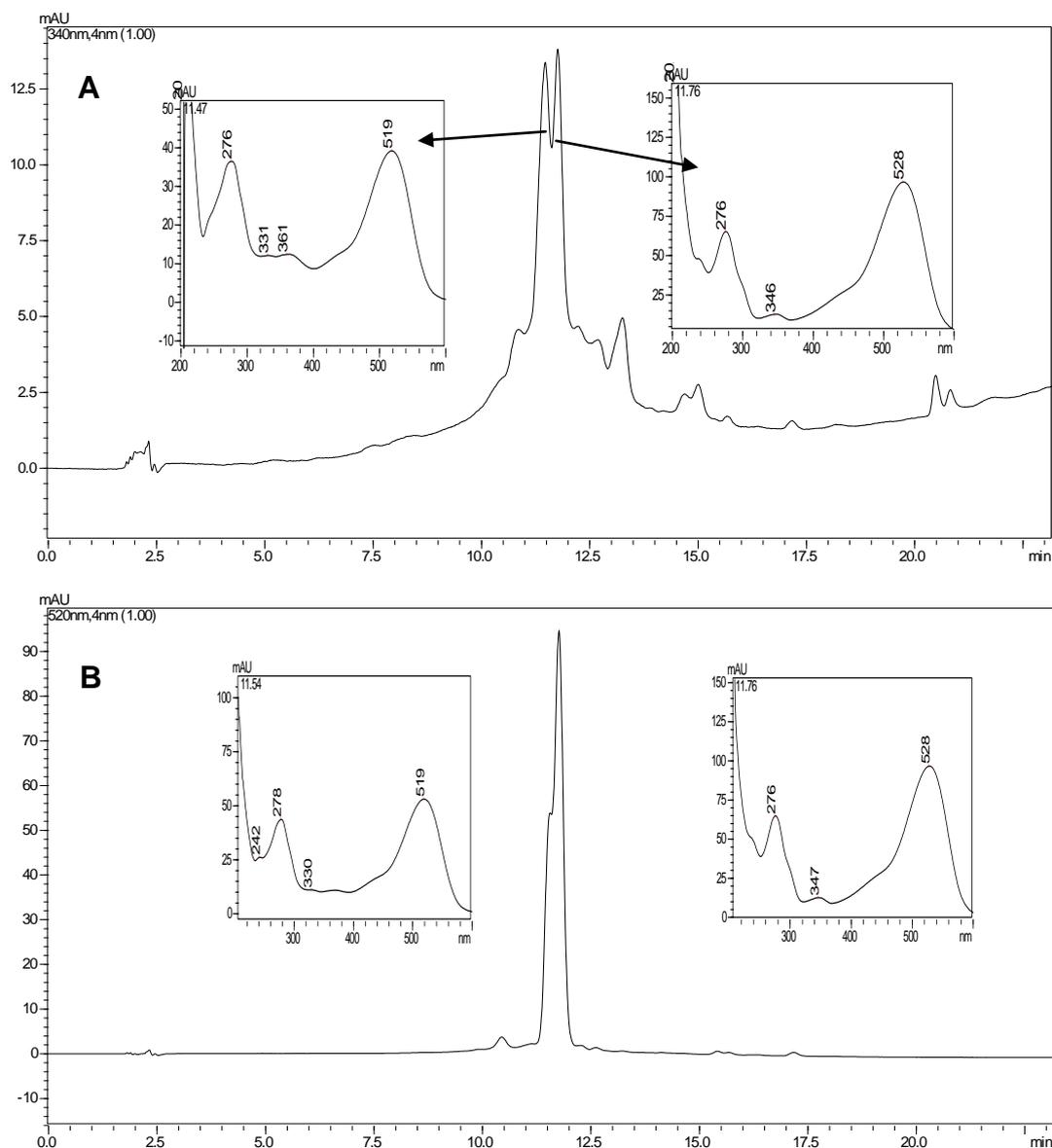


Figura 46. Cromatograma obtido por CLAE-DAD em 340 nm (A), 520 nm (B) espectros de UV de **SH-1**.

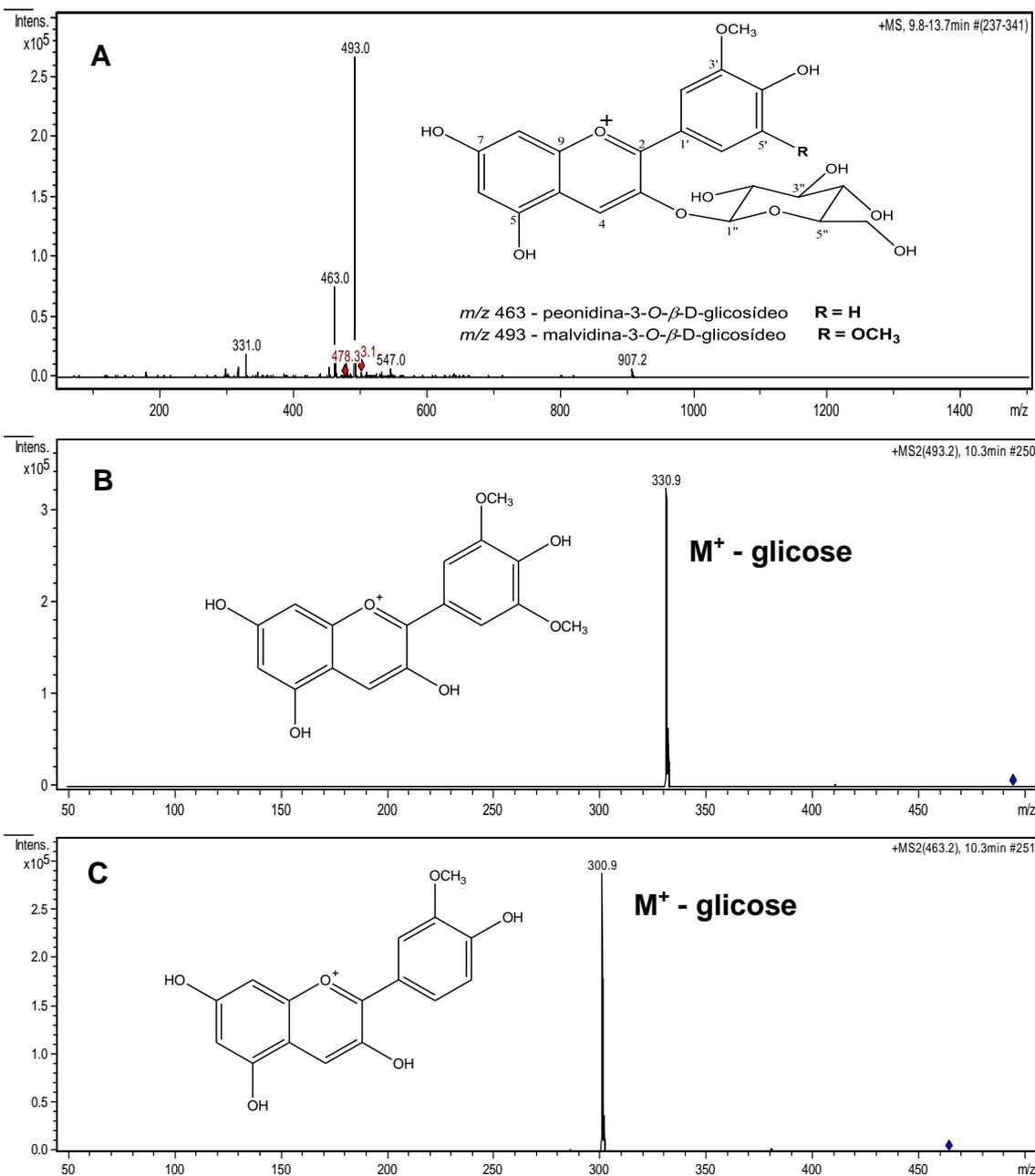


Figura 47. Espectro de massas (ESI-MS) de **SH-1** (A). MS/MS 493 - malvidina-3-O- β -D-glicosídeo (B) e MS/MS 463 - peonidina-3-O- β -D-glicosídeo (C).

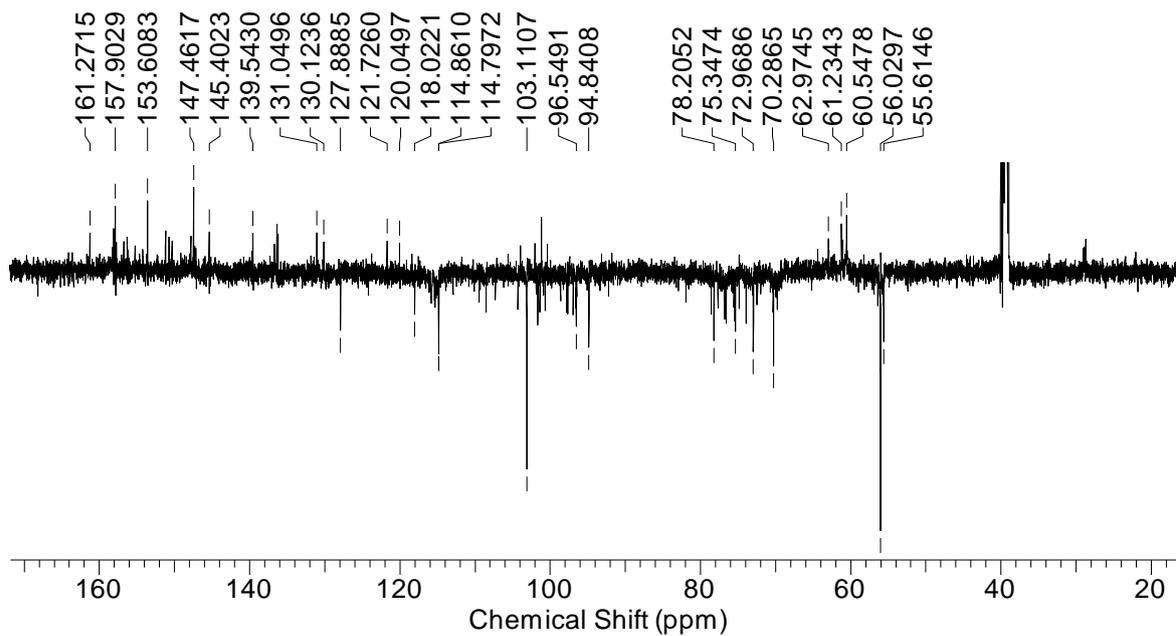
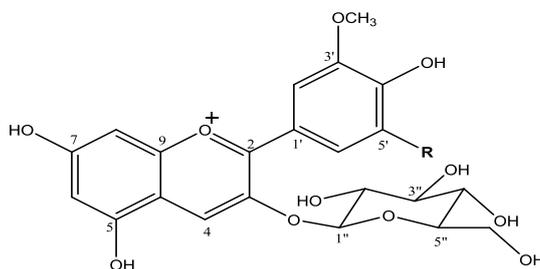


Figura 48. Espectro de APT de **SH-1** em DMSO- d_6 (125 MHz).

Tabela 5. Dados de RMN de APT (125,0 MHz, DMSO-*d*₆) de **SH-1** (malvidina-3-*O*-β-*D*-glicosídeo e peonidina-3-*O*-β-*D*-glicosídeo). Deslocamentos químicos (δ) em ppm.



m/z 463 - peonidina-3-*O*-β-*D*-glicosídeo **R = H**
m/z 493 - malvidina-3-*O*-β-*D*-glicosídeo **R = OCH₃**

	Malvidina-3-<i>O</i>-β-<i>D</i>-glicosídeo	Peonidina-3-<i>O</i>-β-<i>D</i>-glicosídeo
C	δ¹³C	δ¹³C
2	161,27	161,27
3	139,54	139,54
4	127,88	127,88
5	157,90	157,90
6	103,11	103,11
7	Não atribuído	Não atribuído
8	94,84	94,84
9	153,60	153,60
10	120,04	120,04
1'	121,72	121,72
2'	114,79	114,79
3'	147,46	147,46
4'	145,40	145,40
5'	147,46	114,86
6'	114,79	118,02
1''	96,54	96,54
2''	72,96	72,96
3''	75,96	75,96
4''	70,28	70,28
5''	78,20	78,20
6''	60,54	60,54
OCH ₃	56,02	55,61

A substância **SH-2.1** foi obtida como um sólido amorfo amarelo-claro, sua identificação foi feita através de UV, RMN de ^1H e ^{13}C e ESI-MS. O espectro de ultravioleta (UV-vis), obtido por CLAE-DAD (Figura 49), sugere se tratar de um flavonoide. No espectro de RMN de ^1H em DMSO (Figura 50), foi observada a presença de um conjunto de sinais na região de hidrogênios aromáticos sugestivos de um flavonoide. Um duplo duplete em δ_{H} 7,58 (1H, $J= 9,0$ e $2,2\text{Hz}$) e dois dupletos em δ_{H} 7,57 (1H, $J= 2,2$ Hz) e δ_{H} 6,84 (1H, $J= 8,9$ Hz) foram atribuídos ao sistema ABX de um anel aromático trissubstituído (anel B). A existência de dois dupletos, com integração para um hidrogênio cada, em δ_{H} 6,20 e δ_{H} 6,40, com constantes de acoplamento de $J= 2,0$ Hz permitiu identificar o anel A com os hidrogênios acoplado em *meta*. Além disso, o espectro de RMN de ^1H apresentou um conjunto de sinais na região entre 3,0 e 4,0 ppm, característicos de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados e um duplete em δ_{H} 5,46 (1H, $J= 7,5$ Hz) característico de hidrogênio anomérico de β -glicosídeo.

O espectro de APT (Figura 51) apresentou sinais de carbono carbonílico em δ_{C} 177,91, referente ao C4. Seis sinais de carbonos não hidrogenados em δ_{C} 161,71, 164,56, 156,63, 148,92, 145,28 e 133,78 referentes aos C-7, C-5, C-2, C-4', C-3' e C-3, respectivamente. Além disso, observou-se a presença de cinco sinais de carbonos oxigenados na região entre δ_{C} 61,4 – 78,0 bem como, um sinal em δ_{C} 101,30 atribuído ao carbono anomérico da unidade glicosídica. O valor de deslocamento observado para o C-3 permitiu determinar a posição da ligação glicosídica em C-3. (ROSA et al., 2010). Os valores dos espectros de RMN estão na Tabela 6.

O espectro de massas (ESI⁺-MS) (Figura 52) da substância revelou um pico do íon quasimolecular em m/z 465 $[\text{M}+\text{H}]^+$ e m/z 303 $[\text{M}-\text{glicose}]^+$. Esses dados de massa, também são compatíveis com o perfil de fragmentação da delfinidina-3-*O*- β -*D*-glicosídeo, no entanto como o espectro de APT apresentou sinal de carbonila em C4, foi descartado a possibilidade de ser uma antocianina. Com base em todos os dados obtidos e com a comparação na literatura, foi possível identificar **SH-2.1** como sendo a Isoquercetina (quercetina-3-*O*- β -*D*-glicosídeo) (PEREIRA et al., 2012; KAZUMA et al., 2003; ROSA et al., 2010; DOS SANTOS et al., 2005).

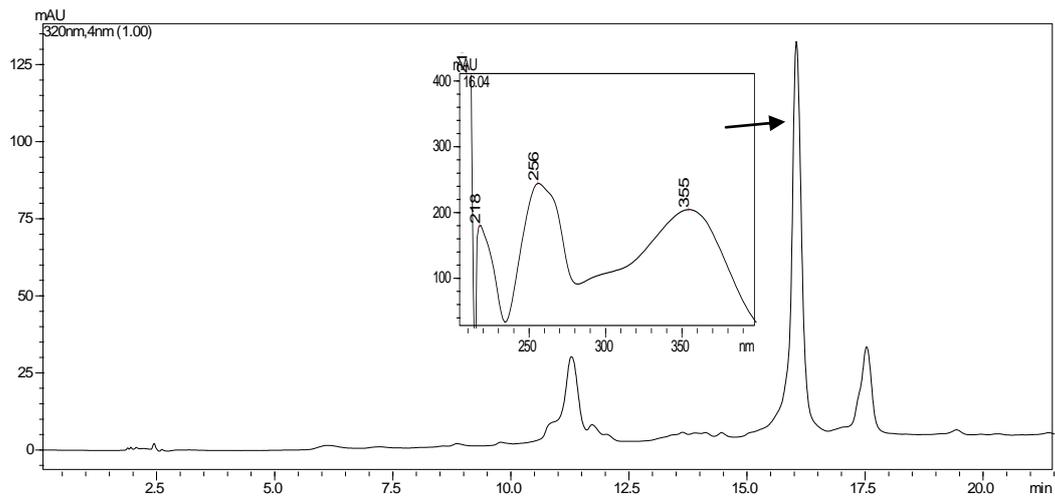


Figura 49. Cromatograma obtido por CLAE-DAD (320 nm) e espectro de UV de **SH-2.1**.

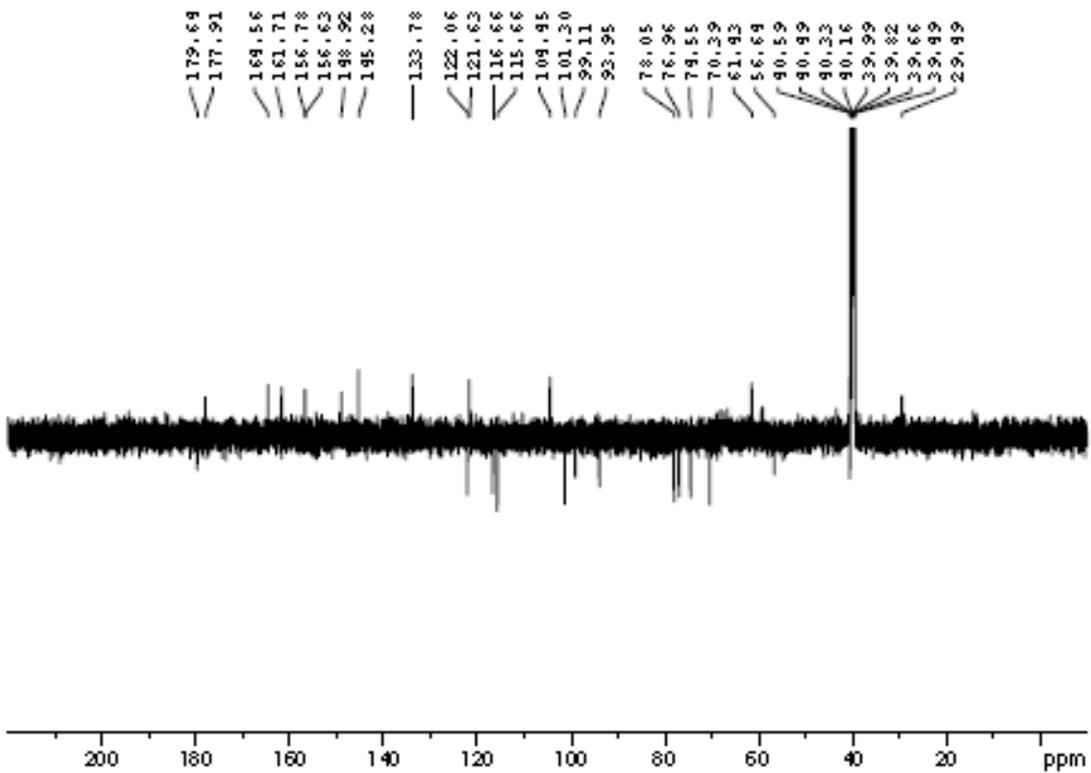


Figura 50. Espectro de APT de **SH-2.1** em DMSO- d_6 (125 MHz)

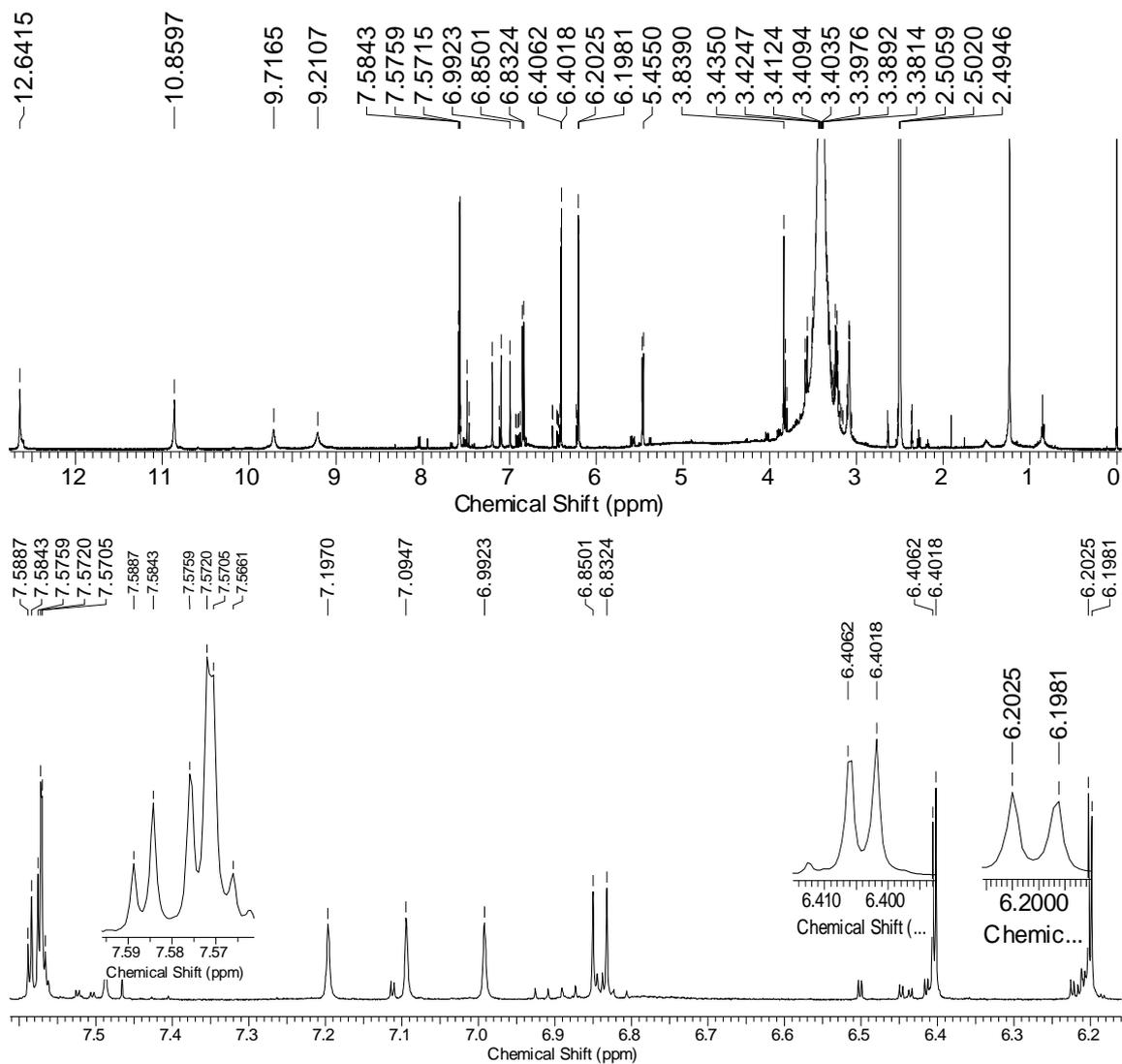


Figura 51. Espectro de RMN de ^1H de **SH-2.1** em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz)

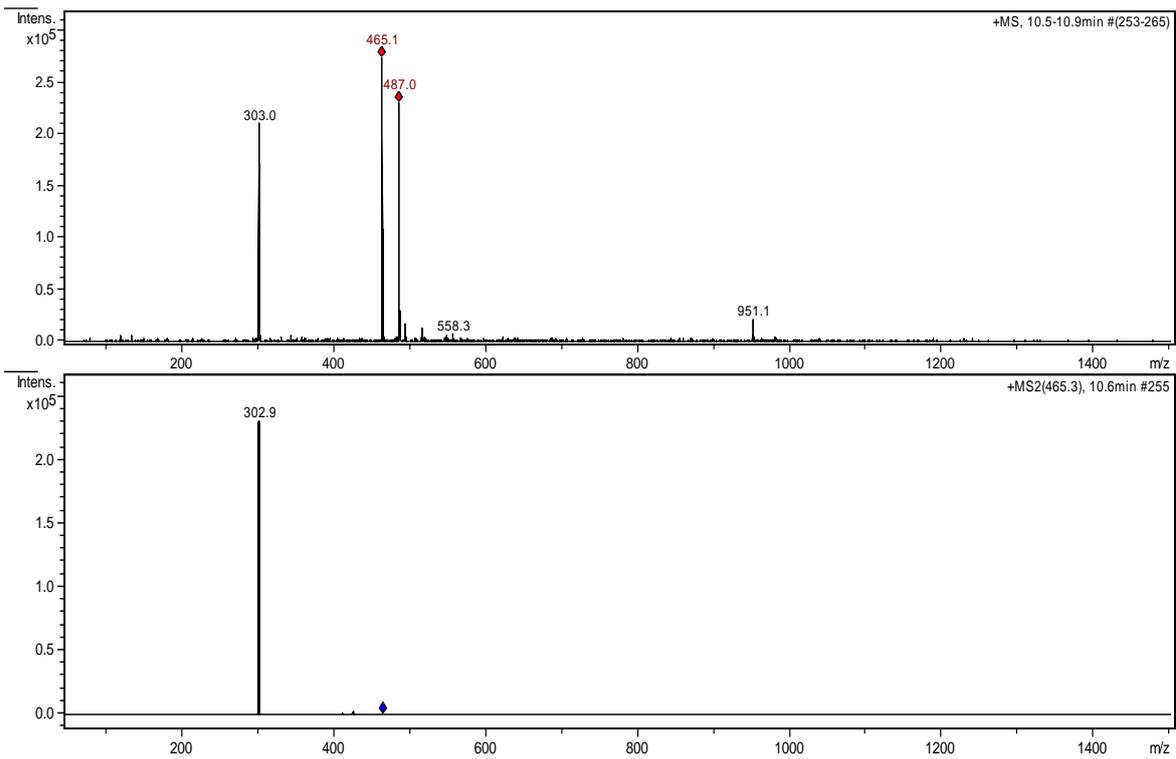
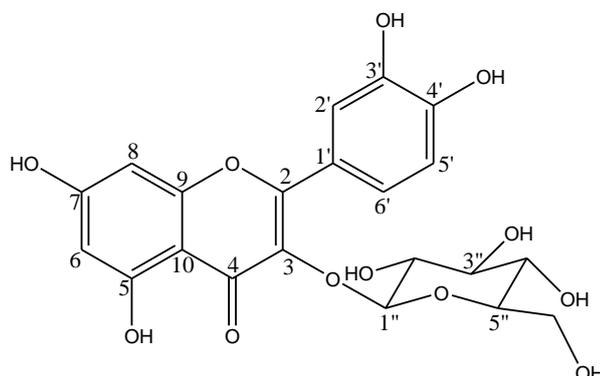


Figura 52. Espectro de massas (ESI⁺-MS) de SH-2.1

Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e APT (500,0 e 125,0 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **SH-2.1** (Isoquercetina). Deslocamentos químicos (δ) em ppm.



C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]
2	156,63	
3	133,78	
4	177,91	
5	161,71	
6	99,11	6,20 (d, $J = 2,0$)
7	164,56	6,40 (d, $J = 2,0$)
8	93,65	
9	156,78	
10	104,45	
1'	122,06	
2'	116,66	7,57 (d, $J = 2,2$)
3'	145,28	
4'	148,92	
5'	115,66	6,84 (d, $J = 8,9$)
6'	121,63	7,58 (dd, $J = 2,2$ e $9,0$)
1''	101,30	5,46 (d, $J = 7,5$)
2''	74,55	3,10 – 4,00 (m)
3''	76,96	3,10 – 4,00 (m)
4''	70,39	3,10 – 4,00 (m)
5''	78,05	3,10 – 4,00 (m)
6''	61,43	3,10 – 4,00 (m)

A substância **SH-2.2** foi obtida como um sólido amorfo amarelo-claro. O espectro de ultravioleta (UV-vis), obtido por CLAE-DAD (Figura 53) demonstra seu caráter flavonoídico. A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C em DMSO (Figuras 54 e 55, respectivamente) da substância **SH-2.2**, com base nos deslocamentos químicos e constantes de acoplamento, permitiu atribuir a presença de um sistema de spins ABX, da mesma forma que foi descrito para a substância **SH-2.1**. A existência de um simpleto em δ_{H} 3,83 no espectro de RMN de ^1H e δ_{C} 55,74 no espectro de APT indicou a presença de um grupo metoxila (OCH_3) adicional quando comparado com a substância **SH-2.1**. A desproteção do C-3 de **SH-2.2**, (δ_{C} 147,50) em relação ao C-3 de **SH-2.1** (δ_{C} 145,28) sugeriu que a metoxila encontrava-se na posição C-3. Os dados espectrais se encontram na Tabela 7.

Os dados de massas ($\text{ESI}^+\text{-MS}$) (Figura 56) da substância revelou um pico do íon quasimolecular em m/z 479 [M^+] e m/z 317 [M^+ - glicose] corroboram com a proposta da presença de uma metoxila a mais, quando comparado com o flavonoide **SH-2.1** (m/z 465 [M^+]). Os dados obtidos e comparação com a literatura possibilitou a identificação de **SH-2.2** como sendo isoramnetina-3- O - β - D -glicosídeo (LEE et al., 2004; DONG-MEI et al., 2012; SILVA et al., 2009). A presença de sinais nos espectros de carbono e hidrogênio, bem como, a presença de outros íons no espectro de massa, como por exemplo o m/z 449, é um indício que **SH-2.2** é uma mistura do flavonoide isoramnetina-3- O - β - D -glicosídeo com a cianidina-3- O - β - D -glicosídeo e/ou um de seus derivados.

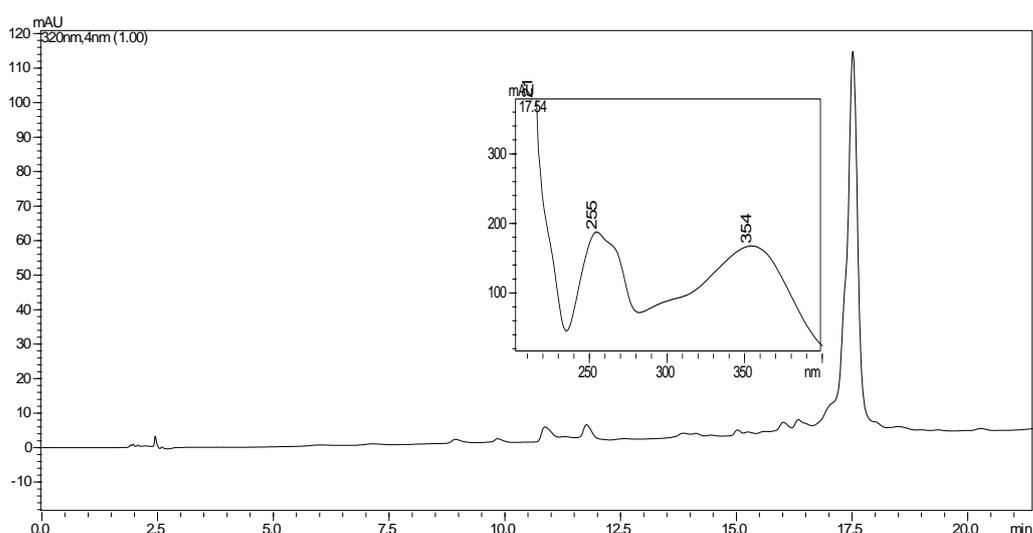


Figura 53. Cromatograma obtido por CLAE-DAD em 320 nm e espectro de UV de **SH-2.2**

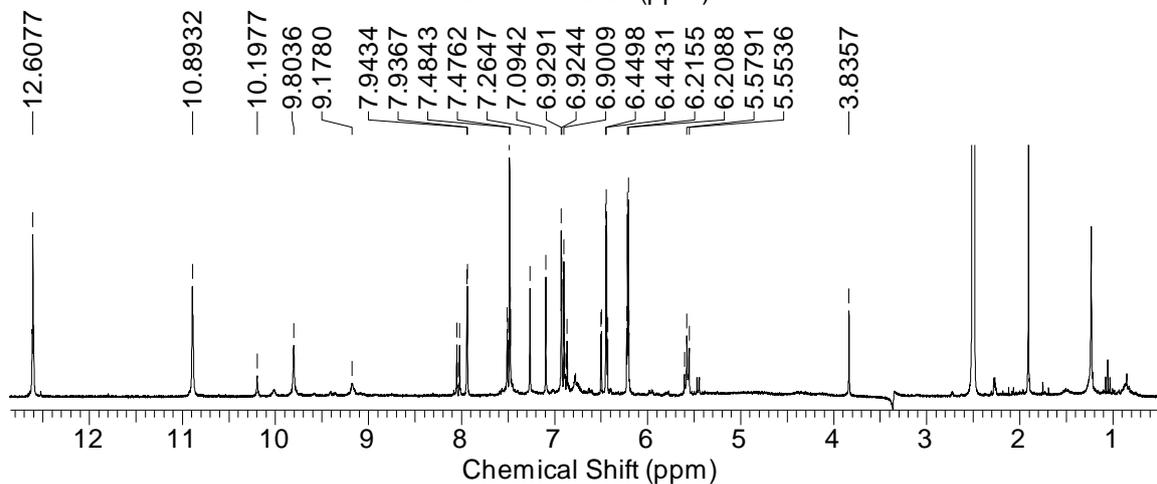
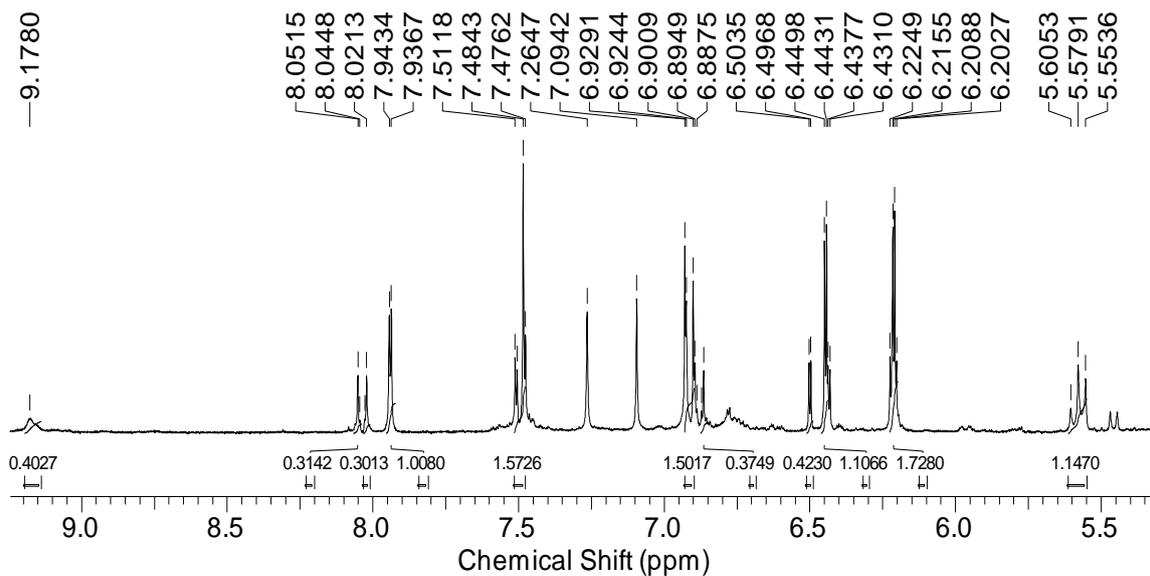


Figura 54. Espectro de RMN de ^1H de **SH-2.2** em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz)

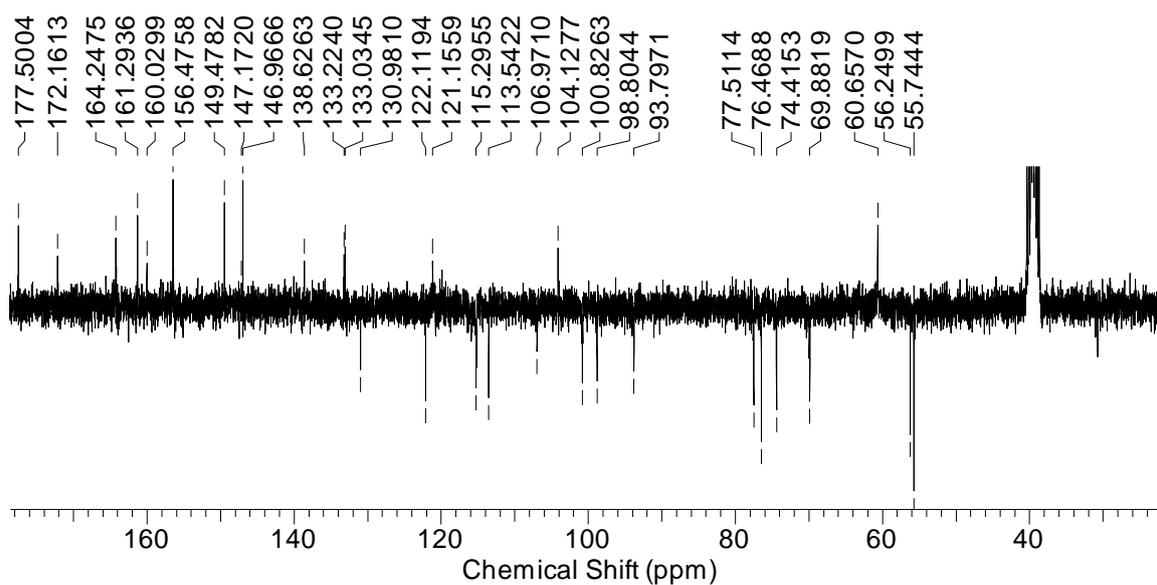


Figura 55. Espectro de APT de **SH-2.2** em $\text{DMSO-}d_6$ (125 MHz)

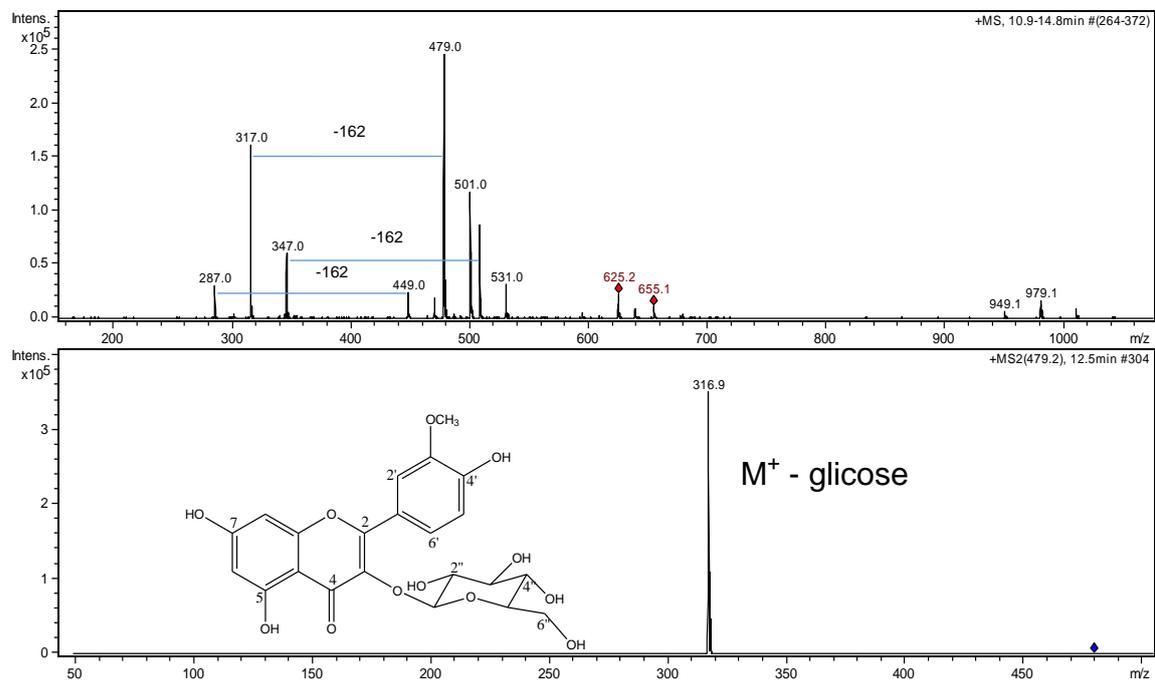
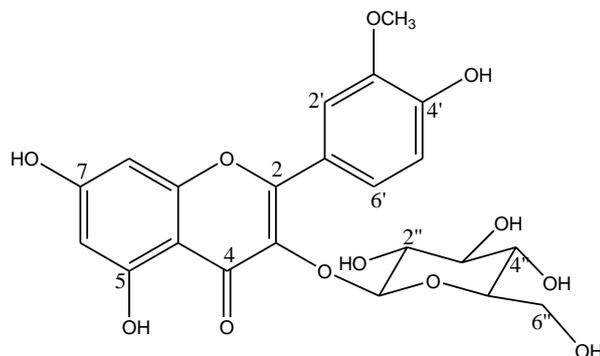


Figura 56. Espectro de massas (ESI⁺-MS) de **SH-2.2**

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e APT (500,0 e 125,0 MHz, DMSO-d_6 , respectivamente) de **SH-2.2** (isoramnetina-3-*O*- β -*D*-glicosídeo). Deslocamentos químicos (δ) em ppm.



C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]
2	156,47	-
3	133,03	-
4	177,50	-
5	161,29	-
6	98,80	6,21 (d, $J=2,0$)
7	164,24	-
8	93,79	6,44 (d, $J=2,0$)
9	156,38	-
10	104,12	-
1'	121,15	-
2'	113,54	7,94 (d, $J=2,0$)
3'	149,47	-
4'	146,96	-
5'	115,29	6,91 (d, $J=8,2$)
6'	122,11	7,49 (dd, $J=2,0$ e $8,2$)
1''	100,82	5,57 (d, $J=7,2$)
2''	74,41	3,00 – 3,80 (m)
3''	76,46	3,00 – 3,80 (m)
4''	69,88	3,00 – 3,80 (m)
5''	77,51	3,00 – 3,80 (m)
6''	60,65	3,00 – 3,80 (m)
OCH_3	55,74	3,89 (s)

A amostra **SH-2.3** foi obtida como um sólido amorfo vermelho, sua identificação foi realizada através de espectros de UV, RMN de ^1H e ^{13}C e MALDI-TOF. A revelação com amônia (NH_3) em CCDa indicou se tratar de uma antocianina. O espectro de ultravioleta (UV-vis), obtido por CLAE-DAD (Figura 57) mostrou duas principais bandas em 283nm e 532nm, características de antocianinas, além de um ombro em torno de 310 nm, sendo indicativo de antocianina acilada. O espectro de RMN de ^1H (Figura 58), mostrou perfil característico de antocianina, devido a presença de um simpleto em δ_{H} 8,90 atribuído ao H-4, sinais na região de hidrogênios aromáticos e simpletos em torno de δ_{H} 3,8 para hidrogênios metoxílicos e entre δ_{H} 3 e 5 indicativos da presença de açúcar. A presença dos sinais em δ_{H} 6,39 e 7,41 com constante de acoplamento de 16,0 Hz confirma a presença do derivado do ácido cinâmico. O espectro apresentou sinais duplicados indicando uma mistura de antocianinas e a sobreposição de alguns sinais dificultaram a atribuição dos H.

O espectro de APT (Figura 59) apresentou sinais em 131,45 ppm atribuído ao C4 da antocianina e os sinais em δ_{C} 149,89 e 115,23 foram atribuídos aos C5' (quaternário) e C5' (metínico) do derivado de malvidina e peonidina, respectivamente. Os sinais de carbonos metínicos em δ_{C} 116,97, 146,92 e 169,43 foram atribuídos aos C α (8'''), C β (7''') e C9''' (carbonila), respectivamente dos carbonos do derivado acila. O carbono quaternário em δ_{C} 158,76 foi atribuído ao C4 caracterizando o grupo *p*-cumaroil. Além disso, foram observados sinais de carbonos oxigenados na região entre δ_{C} 65,10 – 78,25, bem como, em torno de δ_{C} 101,26 que corresponde à unidade glicosídica. Da mesma forma, o espectro de APT mostrou sinais duplicados, confirmando a presença de pelo menos duas antocianinas.

Para a confirmação de **SH-2.3**, foi realizado o espectro de massas MALDI-TOF (Figura 60), que mostrou um pico de maior intensidade em m/z 639 [M^+] e outro menos intenso em m/z 609 [M^+]. O fragmento em m/z 331 [M^+ -146 - 162] em m/z 301 [M^+ -146 - 162] correspondem à perda dos grupos *p*-cumaroil (m/z 146) e glicosídeo (m/z 162). O conjunto dos dados permitiu identificar as antocianinas como malvidina-3-O-(6-O-*p*-cumaroil)-glicosídeo e peonidina-3-O-(6-O-*p*-cumaroil)-glicosídeo (Figura 61), que também foram identificadas no extrato hidroalcoólico do bagaço da uva Shiraz. Os dados espectrais obtidos estão de acordo com dados encontrados na

literatura (VELICKOVSKA et al., 2013; CASTANEDA-OVANDO et al., 2012; FERNANDES et al., 2015; KALINOWSKA et al., 2013; SILVA et al., 2009). A Tabela 8 apresenta os dados de APT da substância **SH-2.3**.

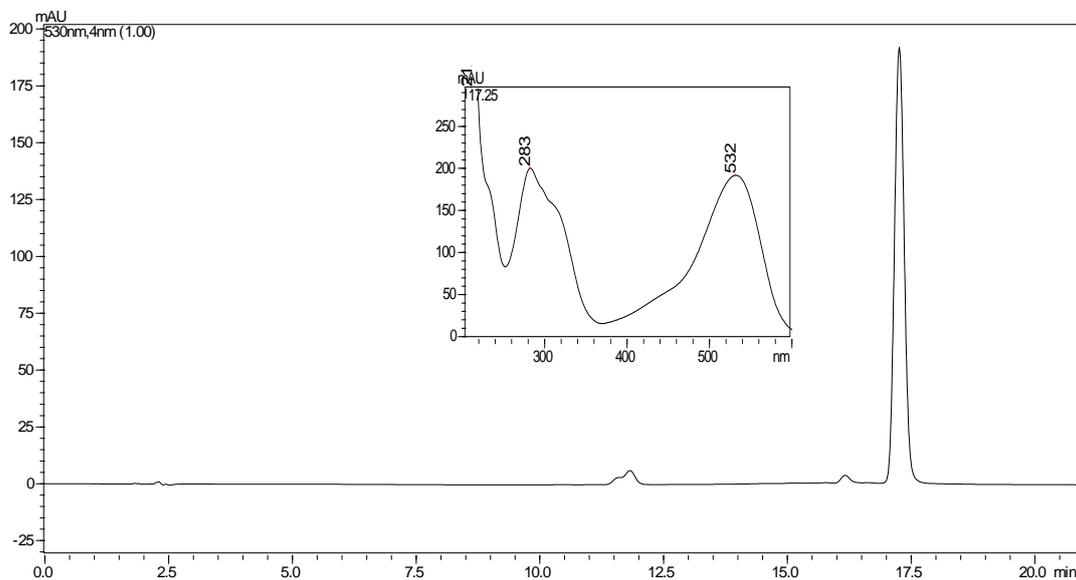


Figura 57. Cromatograma obtido por CLAE-DAD em 520 nm e espectro de UV de **SH-2.3**

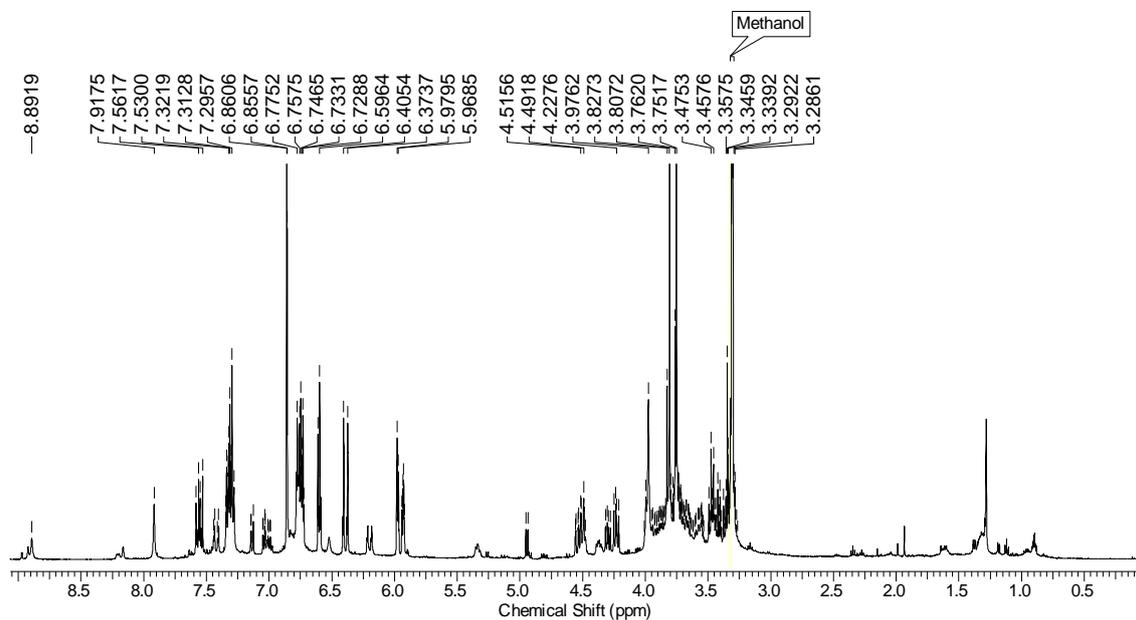


Figura 58. Espectro de RMN de ¹H de **SH-2.3** em Metanol-*d*₄ (300 MHz)

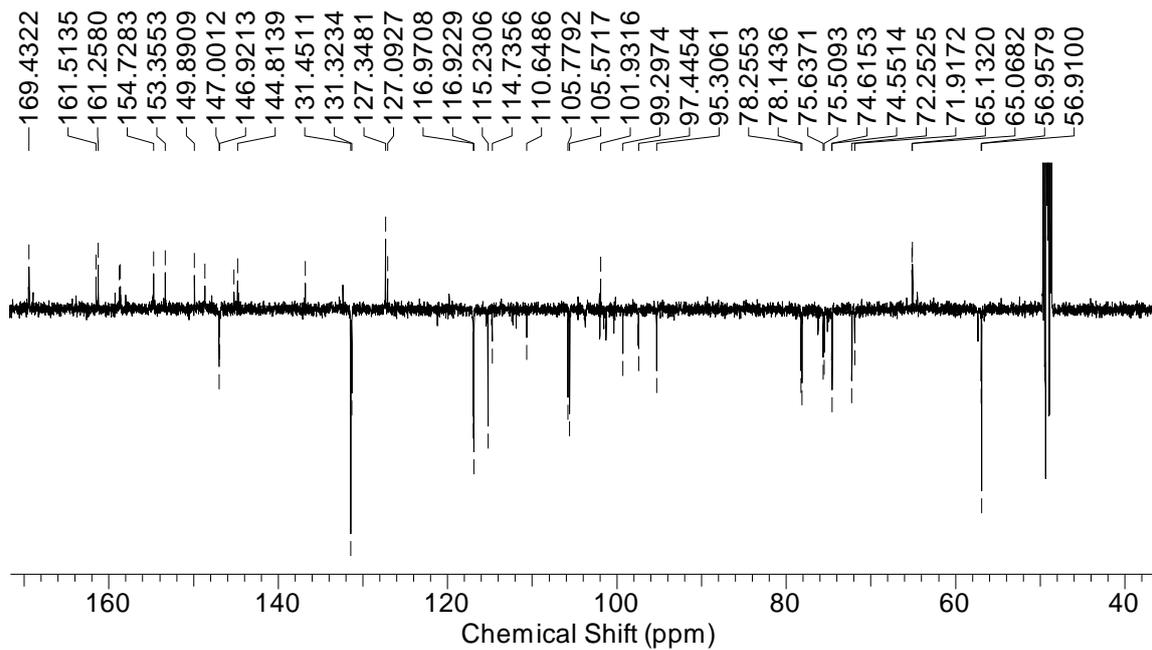


Figura 59. Espectro de APT de SH-2.3 em Metanol- d_4 (125 MHz)

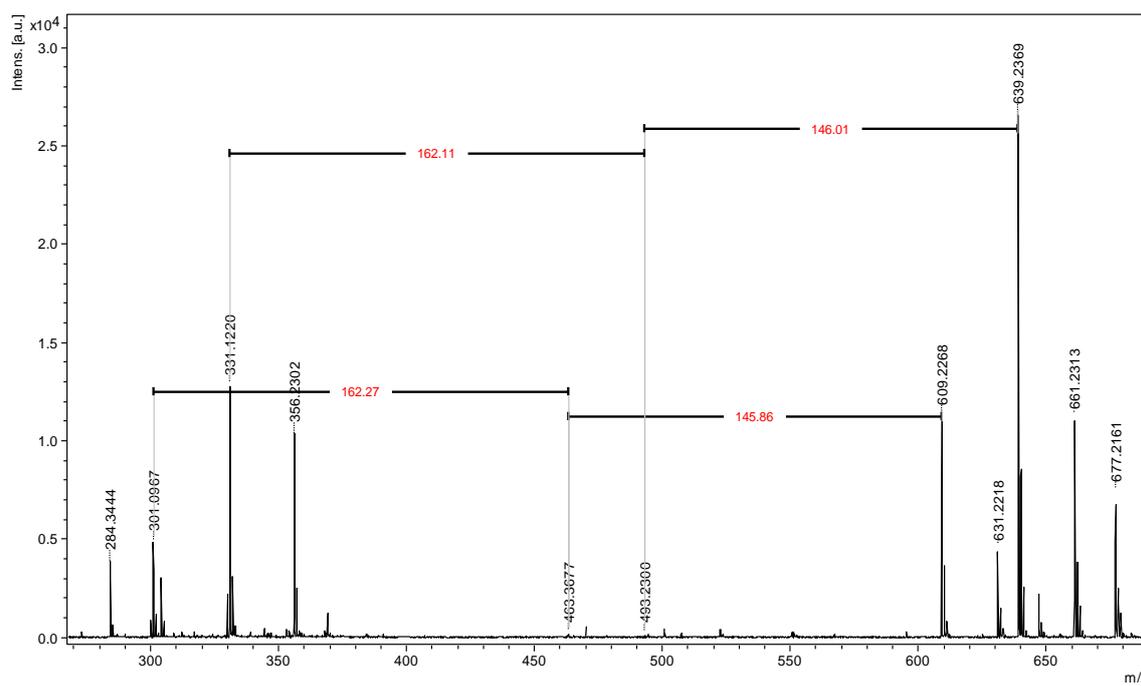
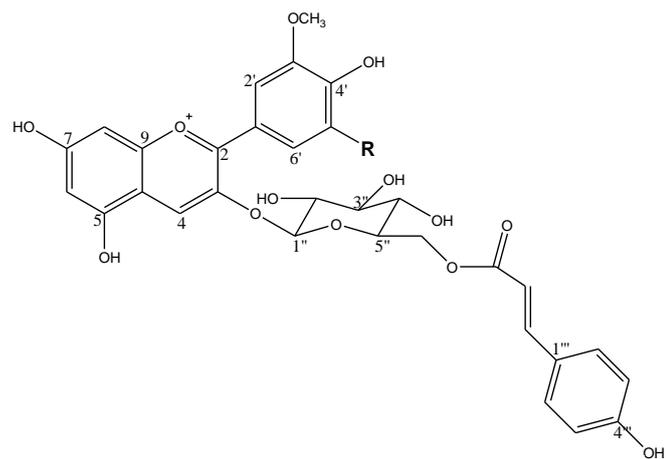


Figura 60. Espectro de massas (MALDI-MS) de SH-2.3



Malvidina-3-O-(6-O-*p*-cumaroil)-glicosídeo **R = OCH₃**
 Peonidina-3-O-(6-O-*p*-cumaroil)-glicosídeo, **R = H**

Figura 61. Estrutura das antocianinas identificadas em **SH-2.3**.

Tabela 8. Dados de RMN de APT (125,0 MHz, Metanol-*d*₄) de SH-2.3 (malvidina-3-O-(6-O-*p*-cumaroil)-glicosídeo e peonidina-3-O-(6-O-*p*-cumaroil)-glicosídeo. Deslocamentos químicos (δ) em ppm.

	Malvidina-3-O-(6-O-<i>p</i>-cumaroil)-glicosídeo	Peonidina-3-O-(6-O-<i>p</i>-cumaroil)-glicosídeo
C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
2	161,51	161,25
3	144,68	144,81
4	131,45	131,45
5	153,35	153,35
6	105,57	105,57
7	Não atribuído	Não atribuído
8	97,44	95,30
9	154,72	154,72
10	101,93	101,93
1'	119,81	119,81
2'	116,92	116,92
3'	149,89	149,89
4'	148,68	148,68
5'	149,89	115,23
6'	116,89	116,89
1''	99,29	99,29
2''	74,61	74,55
3''	78,25	78,14
4''	71,91	71,25
5''	75,50	75,63
6''	65,13	65,06
OCH ₃	56,91	56,95
1'''	127,09	127,27
2'''	131,32	131,32
3'''	105,77	105,77
4'''	158,76	158,65
5'''	105,77	105,77
6'''	131,32	131,32
7'''	146,92	146,00
8'''	116,97	116,97
9'''	169,43	169,43

As antocianinas e flavonoides isolados do bagaço da Shiraz, bem como os fenólicos observados para os extratos das cascas e sementes da uva Moscato, justificam a utilização desses resíduos na produção de uma tinta anti-incrustante a base de compostos naturais, tais como os fenólicos.

O Processo de fabricação dos vinhos e sucos de uva influencia na quantidade de fenólicos extraídos (DIAS, 2009; SOVAK, 2001). Uma vez que a maior parte dessas substâncias se concentra na casca das uvas, quanto maior o tempo de contato do mosto com a casca ou a intensidade da prensagem, maior o teor de fenólicos. A grande diferença entre a vinificação em tinto e em branco é que o último é realizado com a ausência das cascas ou sem maceração das mesmas, influenciando diretamente na quantidade de fenólicos no mosto.

Muitos trabalhos têm sido publicados investigando as atividades biológicas tanto do vinho quanto do suco de uva e do resveratrol e análogos isolados (DÍAZ et al., 2007; SOVAK, 2001; BHAT et al., 2001; PAIXÃO et al., 2008). Estes trabalhos mostram que os efeitos cardioprotetores e antioxidantes do vinho são, provavelmente, decorrentes dos altos teores de compostos fenólicos presentes nesta bebida. Provavelmente essa ação é creditada ao efeito aditivo ou potencializador dos fenólicos, pois apesar de exibirem atividade biológica, *in vitro* e *in vivo*, quando isolados tanto o resveratrol, quanto os outros fenólicos não possuem biodisponibilidade em concentrações mínimas para alcançar esses efeitos *in vivo*.

5.5. Caracterização química do extrato etanólico da semente da uva Moscato por MALDI-TOF-MS e ESI-TOF-MS.

No espectro de MALDI-TOF da semente da variedade Moscato (Figura 62) observou-se a presença de uma série homóloga consistente à proantocianidinas oligoméricas intercaladas por 288 Da que foi atribuída a uma unidade de (epi)catequina. Proantocianidina é uma das principais classes de substâncias presentes nas sementes de uvas (BORDIGA et al., 2011; ROCKENBACH et al., 2012; FLAMINI, 2013). No geral as principais proantocianidinas presentes em sementes de uvas são oligômeros de (epi)catequina (procianidina),

(epi)galocatequina (prodelfinidina) e (epi)afzelequina (propelargonidina). A identificação desses taninos por MALDI-TOF foi realizada com base na equação: $288a + 304b + 272c + 2 + 23$, onde a é o número de unidades de (epi)catequina, b é o número de unidades (epi)galocatequina, c é o número de unidades (epi)afzelequina, 2 corresponde ao número de átomos de hidrogênio adicionais na subunidade terminal e 23 é a massa atômica do sódio (VAN HUYNH; BEVINGTON, 2014). Observou-se também a presença de diferença de massa de 152 Da que foi atribuído ao grupo galoil. Apesar da baixa ionização observada para as proantocianidinas presentes no extrato etanólico da semente, foi possível realizar a identificação de proantocianidinas com grau de polimerização variando de 1-6 (Figura 63, Tabela 9), baseado principalmente, nos dados encontrados na literatura (YANG; CHIEN, 2000; ZHANG; LIN, 2008; VAN HUYNH; BEVINGTON, 2014).

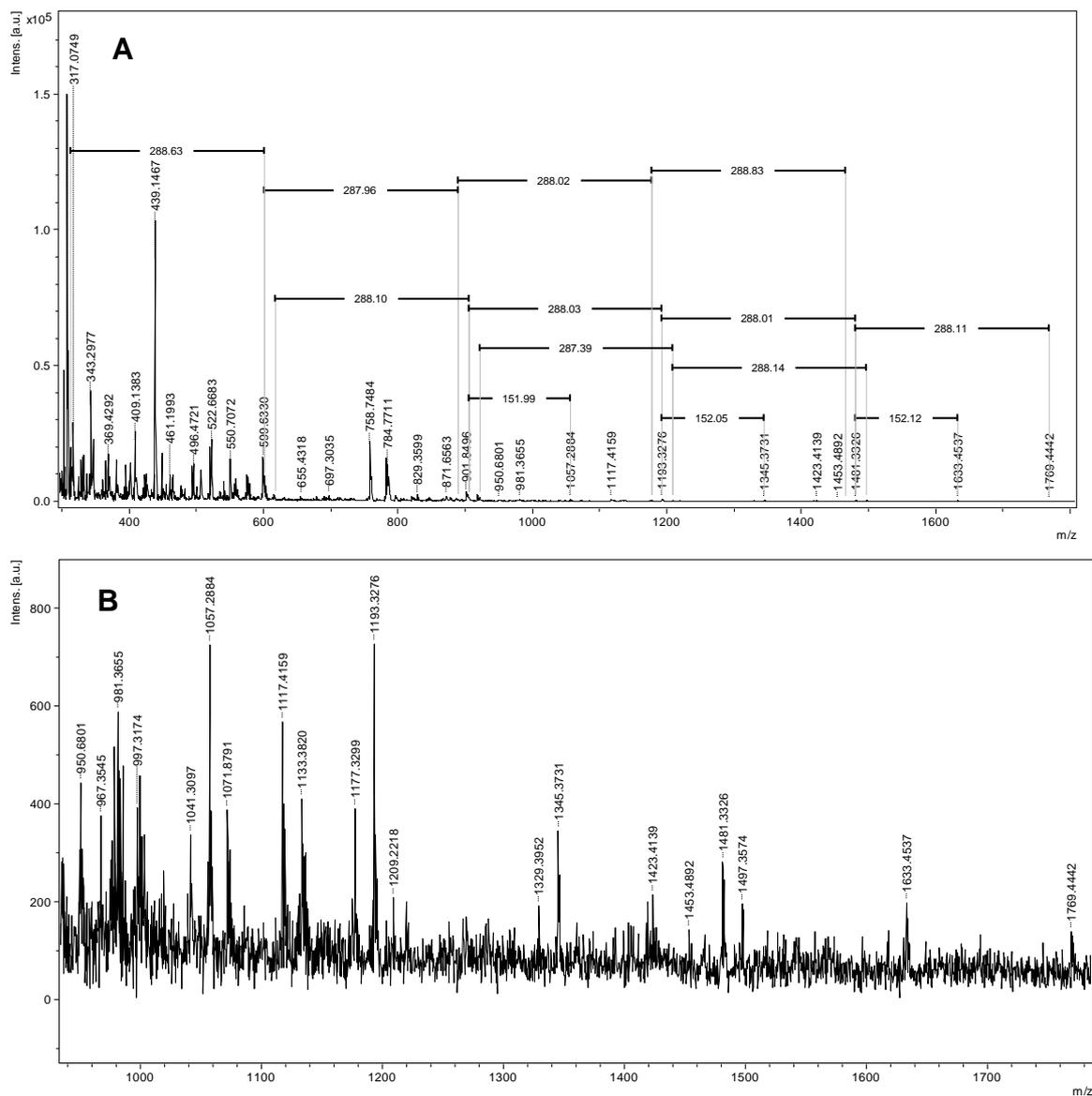


Figura 62. Espectro de massas (MALDI-TOF) do extrato etanólico das sementes Moscato. **A)** Faixa de íons com m/z de 300-1800 Da. **B)** Faixa de íons com m/z de 920-1770 Da.

Tabela 9. Proantocianidinas identificadas no extrato da semente de uva Moscato. Cálculos de massa foram feitas com base na equação $288a + 304b + 152c + 2 + 23$, onde a é o número de unidades procianidina, b é o número de unidades prodelfinidina, e c é o número de grupos galoil, 2 corresponde ao número de hidrogênio adicional nas subunidades terminais e 23 é a massa atômica de sódio.

Grau de polimerização	Nº de unidades procianidina	Nº de unidades prodelfinidina	Nº de unidades galoil	Calculado [M + Na] ⁺	Observado [M + Na] ⁺
Monômeros	1	0	0	313	313
	0	1	0	329	329
Dímeros	1	1	0	617	617
	0	2	0	601	601
Trímeros	0	3	0	889	889
	1	2	0	905	905
	2	1	0	921	921
	2	1	1	1057	1057
	1	2	1	1073	1073
Tetrâmeros	4	0	0	1177	1177
	3	1	0	1193	1193
	2	2	0	1209	1209
	4	0	1	1329	1329
	3	1	1	1345	1345
Pentâmeros	5	0	0	1465	1465
	4	1	0	1481	1481
	3	2	0	1497	1497
Hexâmero	5	1	0	1769	1769

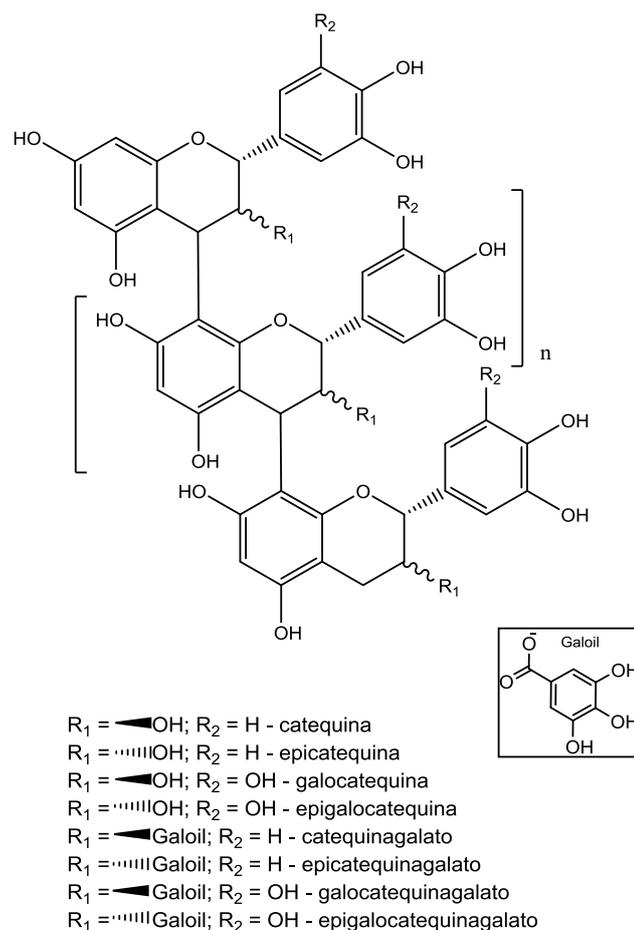


Figura 63. Proantocianidinas identificadas por MALDI-TOF do extrato etanólico da semente da uva Moscato.

No intuito de identificar outros polifenóis do extrato das sementes da cv. Moscato foi realizado a análise por UPLC-MS em modo TIC e ESI – MS (infusão direta), nos modos positivos e negativos (Figura 64 e 65). Na análise dos espectros fica evidente a presença de proantocianidinas, assim como foi visto no espectro de MALDI. Os sinais de m/z 289 [M-H]⁻, 577 [M-H]⁻, 865 [M-H]⁻ e 1153 [M-H]⁻ foram interpretados como os íons de um monômero, dímero, trímero e tetrâmero da (epi)catequina, respectivamente. Os sinais das moléculas desprotonadas de m/z 729 [M-H]⁻ e m/z 1017 [M-H]⁻, as quais são 152 unidades superiores à m/z 577 e 865 Da, respectivamente, sugerem a presença de um grupo galoil nessas proantocianidinas. No geral, observamos os mesmos íons no modo positivo.

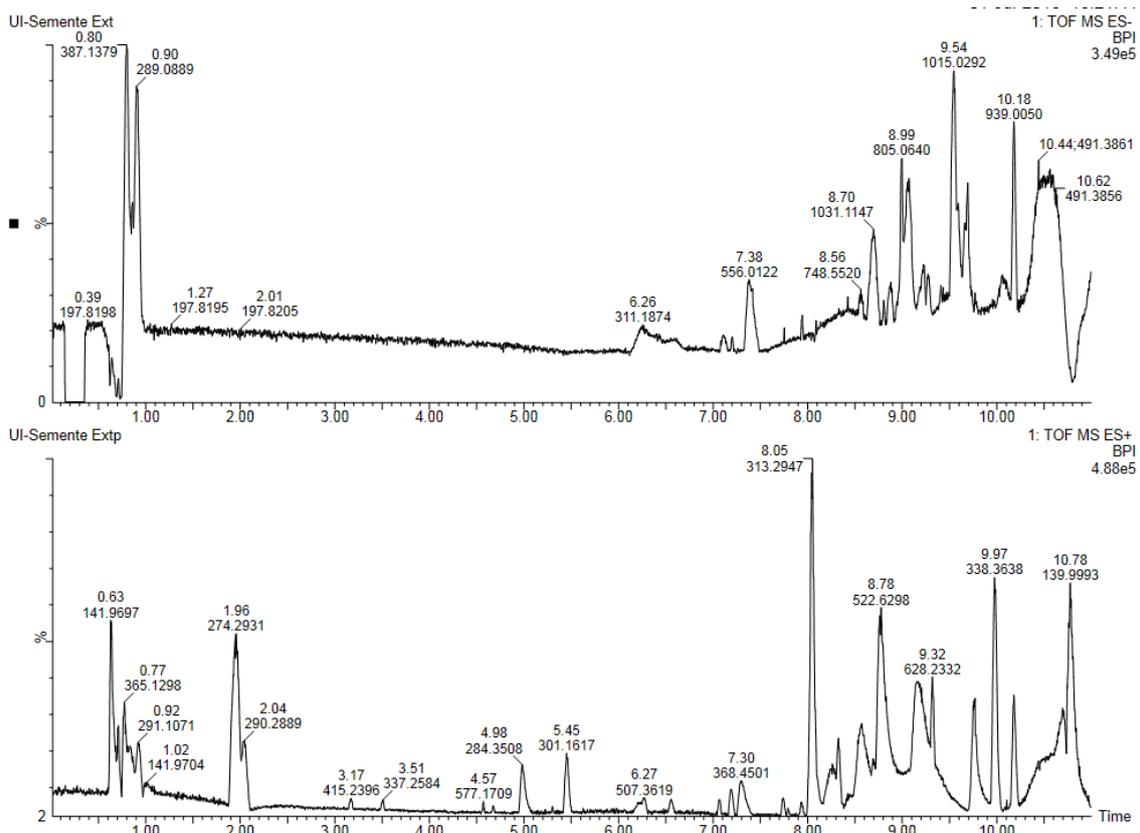


Figura 64. Cromatograma de UPLC-MS em modo TIC do extrato etanólico das sementes da uva Moscato

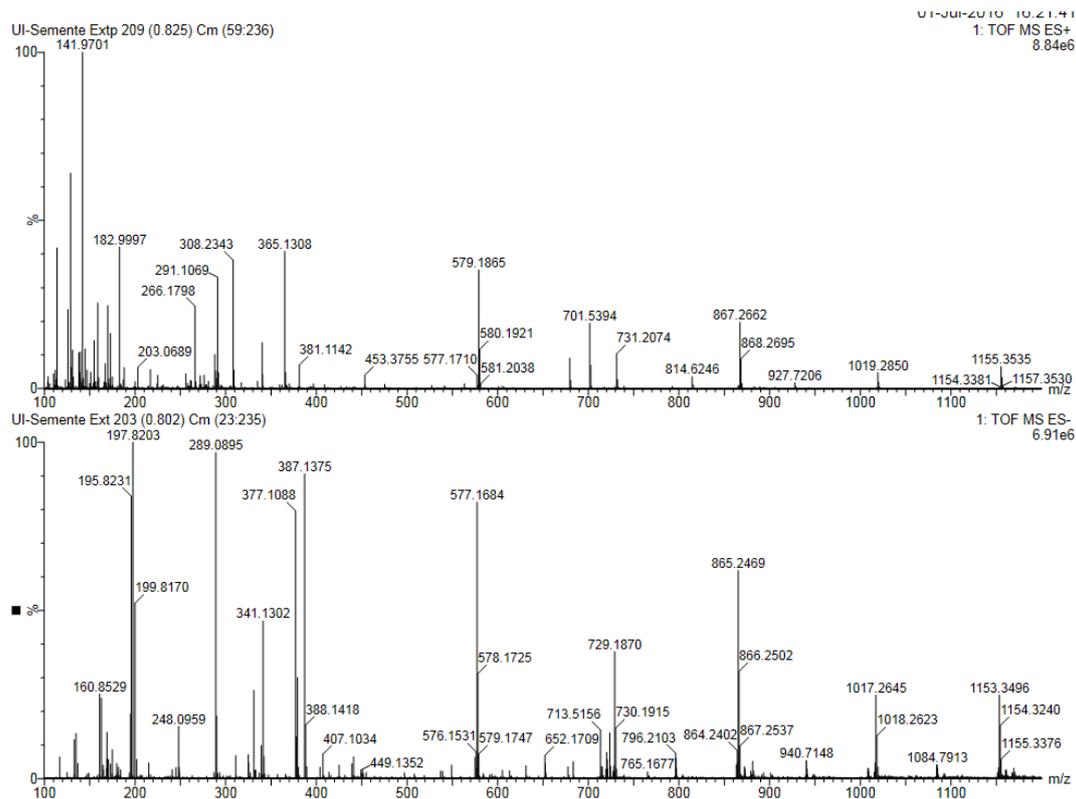


Figura 65 Espectro de ESI-MS do extrato etanólico semente Moscato em modo negativo e positivo.

5.6. Caracterização química do extrato acetona/água (7:3) da casca da uva Moscato por MALDI-TOF-MS e ESI-TOF-MS

Na análise por MALDI-TOF das cascas da uva Moscato foi possível observar a presença de proantocianidinas, a caracterização foi realizada da mesma maneira da semente. A identificação por MALDI-TOF foi realizada com base na equação: $288a + 304b + 272c + 2 + 23$, onde a é o número de unidades de procianidina, b é o número de unidades prodelfinidina, C é o número de unidades propelargonidina, 2 corresponde ao número de átomos de hidrogênio adicionais na subunidade terminal e 23 é a massa atômica do Na (VAN HUYNH; BEVINGTON, 2014). Foram identificadas 6 proantocianidinas, no entanto, no espectro de massas (MALDI-TOF) (Figura 66) é verificado a presença de outros compostos que não foram identificados. O íon de m/z 842 foi atribuído ao trímero de (epi)afzelequina, a partir

desse íon é possível observar um série de proantocianidinas cuja diferença é de 288 Da da anterior, correspondendo a uma unidade de (epi)catequina (Figura 66-b). Observa-se também a diferença de 152 Da atribuído ao grupo galoi. As proantocianidinas identificadas no extrato acetona 70% estão apresentadas na Figura 67 e na Tabela 10.

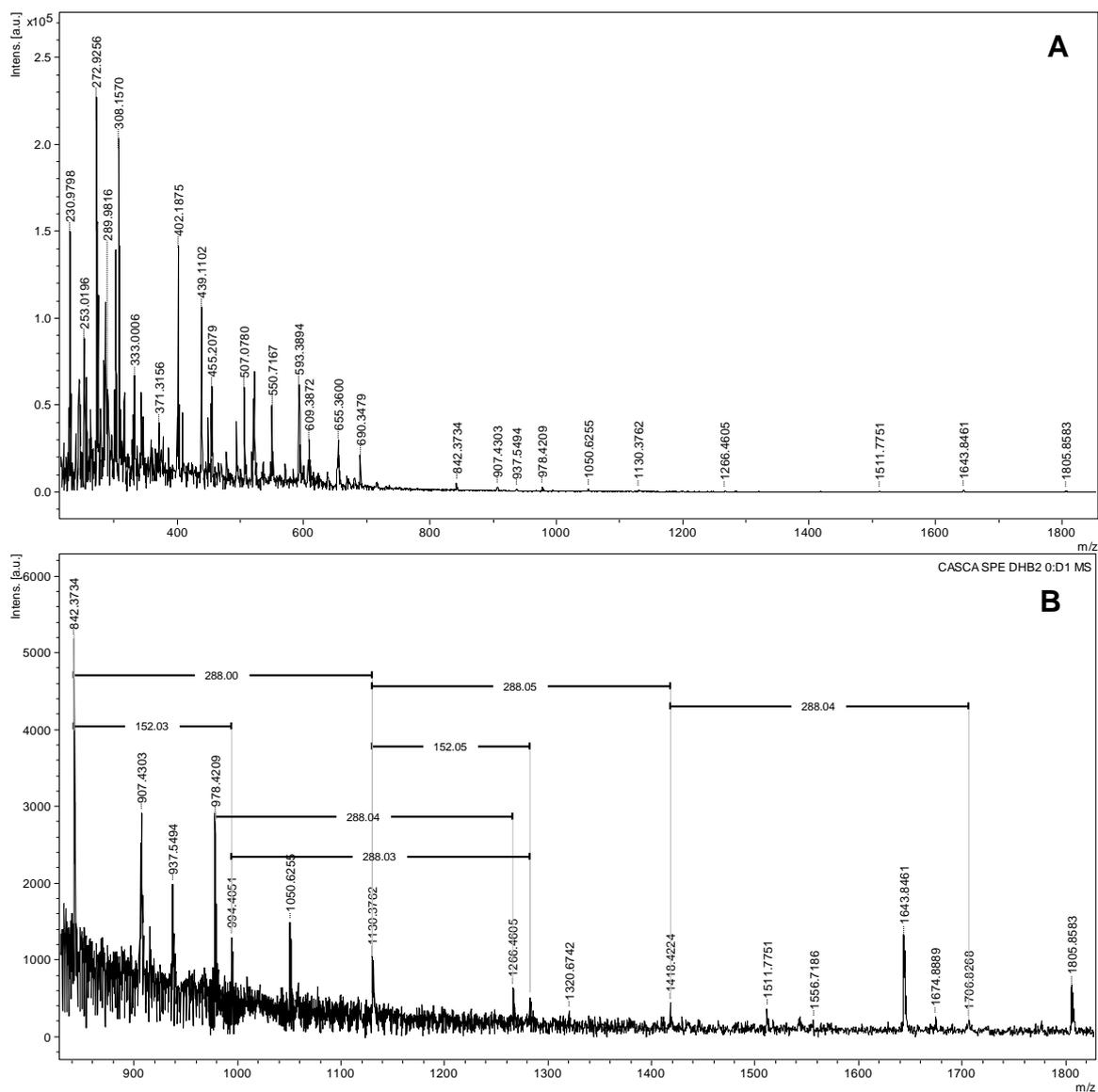
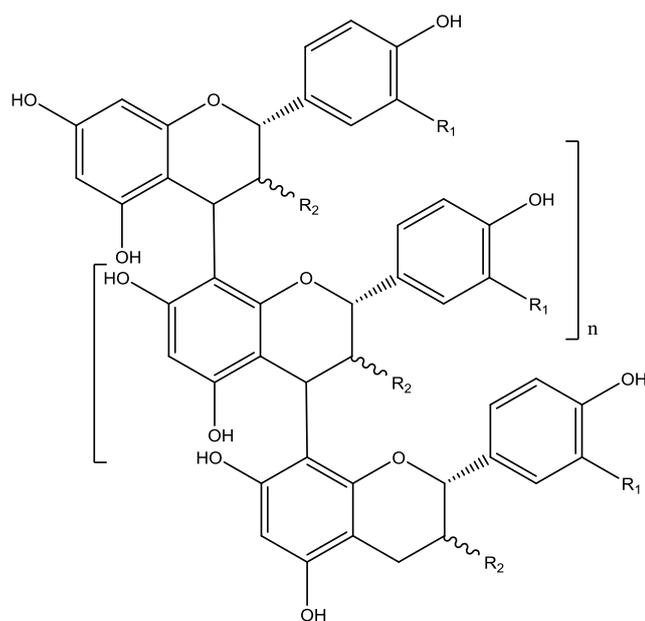


Figura 66. Espectro de MALDI-TOF-MS do extrato hidroacetônico da casca da uva Moscato (**A**) e expansão de 800 a 1810 Da (**B**).

Tabela 10. Proantocianidinas identificadas no extrato da casca de uva Moscato. Cálculos de massa foram feitas com base na equação $288a + 272b + 152c + 2 + 23$, onde a é o número de unidades (epi)catequina, b é o número de unidades (epi)afzelequina, e c é o número de grupos galoil, 2 corresponde ao número de hidrogênio adicional nas subunidades terminais e 23 é a massa atômica de sódio.

Grau de polimerização	Nº de unidades procianidina	Nº de unidades propelargonidina	Nº de unidades galoil	Calculado $[M + Na]^+$	Observado $[M + Na]^+$
Trímeros	0	3	0	841	842
	0	3	1	993	994
Tetrâmeros	1	3	0	1130	1130
	1	3	1	1282	1282
Pentâmeros	2	3	0	1418	1418
Hexâmero	3	3	0	1706	1706



$R_1 = H, R_2 = OH$ - (epi)afzelequina
 $R_1 = OH, R_2 = OH$ - (epi)catequina
 $R_1 = H, R_2 = \text{Galoil}$ - (epi)afzelequinagalato
 $R_1 = OH, R_2 = OH$ - (epi)catequinagalato

Figura 67. Proantocianidinas identificadas por MALDI-TOF do extrato acetona 70% da casca de uva Moscato.

Na tentativa de conseguir identificar/confirmar os fenólicos da casca da uva Moscato foi realizado a análise por UPLC-PDA-qTOF-MS (Figura 68 e 69), no

entanto, só os dados de MS não foram suficientes para a identificação dos compostos, sendo necessária a realização de novas análises e modificações do método utilizado.

Apesar da existência de diversos trabalhos, que relatam a identificação de taninos em uva, a identificação desses polifenóis não é uma tarefa fácil, principalmente por que as moléculas têm grande variação estrutural, que é resultado de padrões de substituições entre unidades flavânicas, diversidade de posições das ligações e de estereoquímica (VIVAS et al., 2004; TALA et al., 2013; TENG et al., 2015; SCHOFIELD et al., 2001; ES-SAFI et al., 2006; PING et al., 2012).

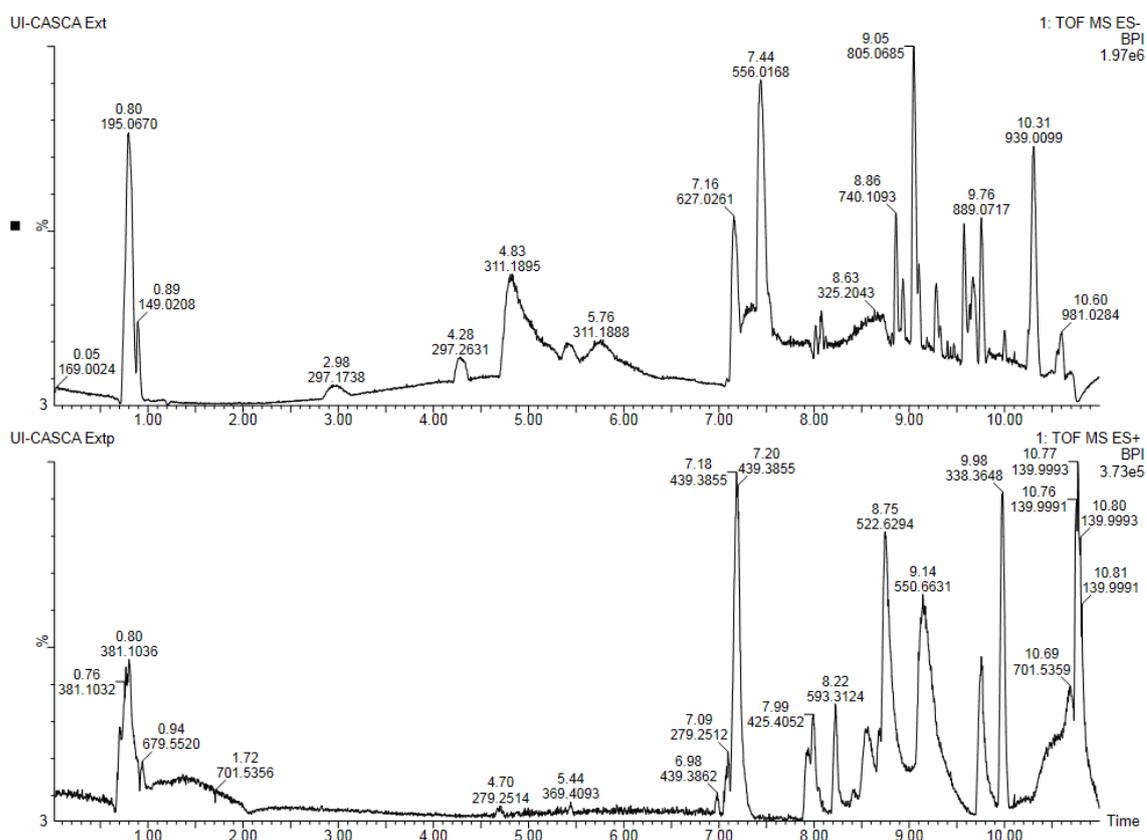


Figura 68. Cromatograma de UPLC-MS em modo TIC do extrato acetona 70% das cascas da uva Moscato

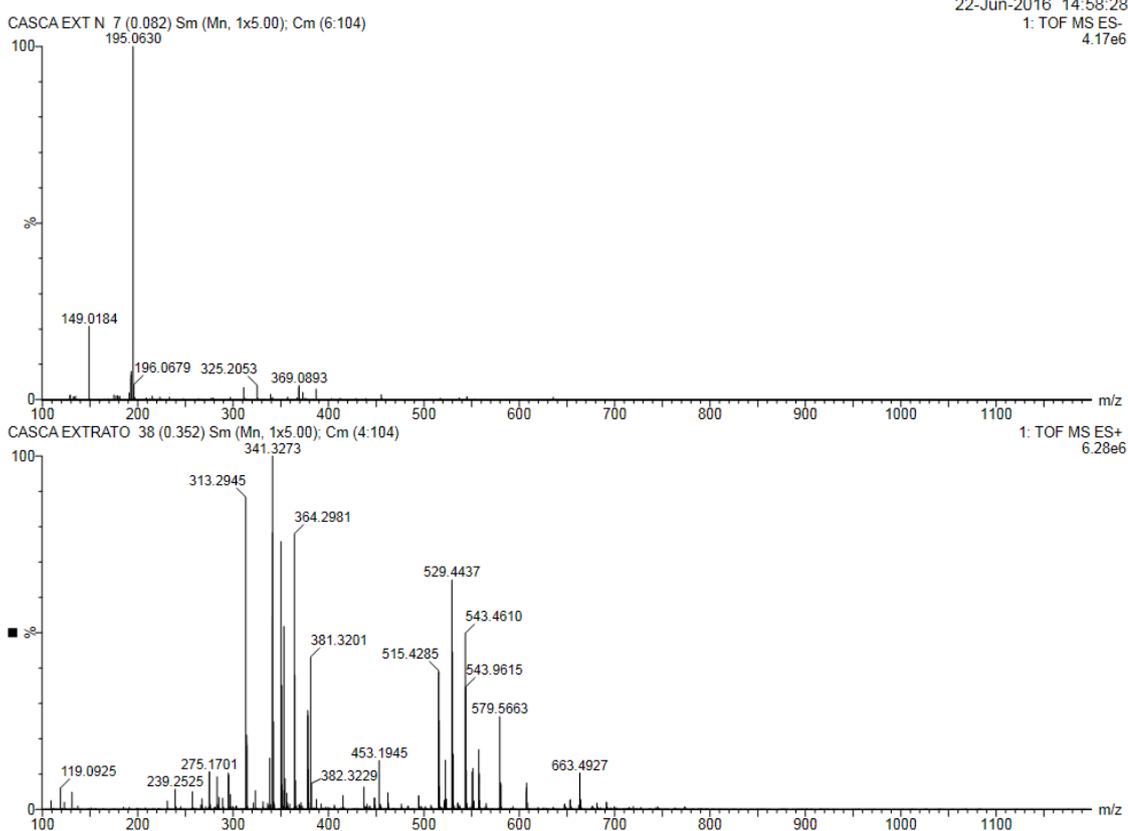


Figura 69. Espectro de ESI-MS do extrato acetona 70% da casca Moscato em modo negativo e positivo.

Ao comparar os dados obtidos nos testes qualitativos de teor de flavonoide, antocianinas, taninos condensados e galotaninos com os dados de massas dos extratos é observado, em parte, coerência entre os dois resultados. O extrato das sementes da uva Moscato, por exemplo, apresentou alto teor de taninos condensados que corroboram com os dados de massas.

5.7. Síntese e caracterização por espectroscopia de infra-vermelho e MALDI-TOF do complexo resíduo uva-cobre.

A síntese do derivado resíduo uva-cobre foi realizada em triplicata sendo utilizado cerca de 1,0 g de extratos de uva e foram obtidos 1,22 a 2,23 g dos derivados resíduo-cobre. No geral, a complexação com o cobre ocorreu de forma

semelhante nas cascas e semente da uva Moscato. O bagaço da uva Shiraz apresentou um maior rendimento do complexo com cerca de 2,20 g (Tabela 11).

Tabela 11. Rendimento dos complexos extrato-cobre

Amostras	Casca Moscato acetona 70%			Semente Moscato etanol			Shiraz bagaço etanol 80%		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Peso do extrato (g)	1,00	1,00	1,01	1,03	1,02	1,02	1,04	1,10	1,03
Peso do complexo de Cu (g)	1,18	1,21	1,24	2,11	2,22	2,34	1,29	1,24	1,38

A caracterização dos derivados resíduo-cobre foi realizada através de análise de IV, onde foram analisados os extratos brutos e comparados com os extratos dos derivados resíduo-cobre. Para o espectro dos extratos dos resíduos (Moscato casca acetona 70%, Moscato semente etanol e Shiraz bagaço etanol 80%) foram observadas as bandas de absorção em torno de 1723 cm^{-1} (C=O) e em 3379 cm^{-1} (OH) para grupos carboxilas dos derivados de ácidos carboxílicos, como também as bandas de absorção para carbonilas conjugadas dos possíveis flavonóides em 1611 cm^{-1} . Esta última banda de C=O permaneceu nos derivados com cobre. É possível observar também uma banda em torno de $601\text{-}604\text{ cm}^{-1}$ para os derivados de cobre, e inexistente na mesma faixa de número de onda para os extratos. Estes estiramentos são atribuídos a átomos de carbono ligados a oxigênios de óxido metálicos (R-C-O...Cu), atribuído ao óxido de cobre presente nos derivados. (ANDRADE, et al., 2010). Estas últimas bandas reforçam a interação entre os íons cobre e os grupos hidroxilas presente no resíduo (Figuras 70 - 72). As mesmas características e perfis foram observados nos outros extratos analisados.

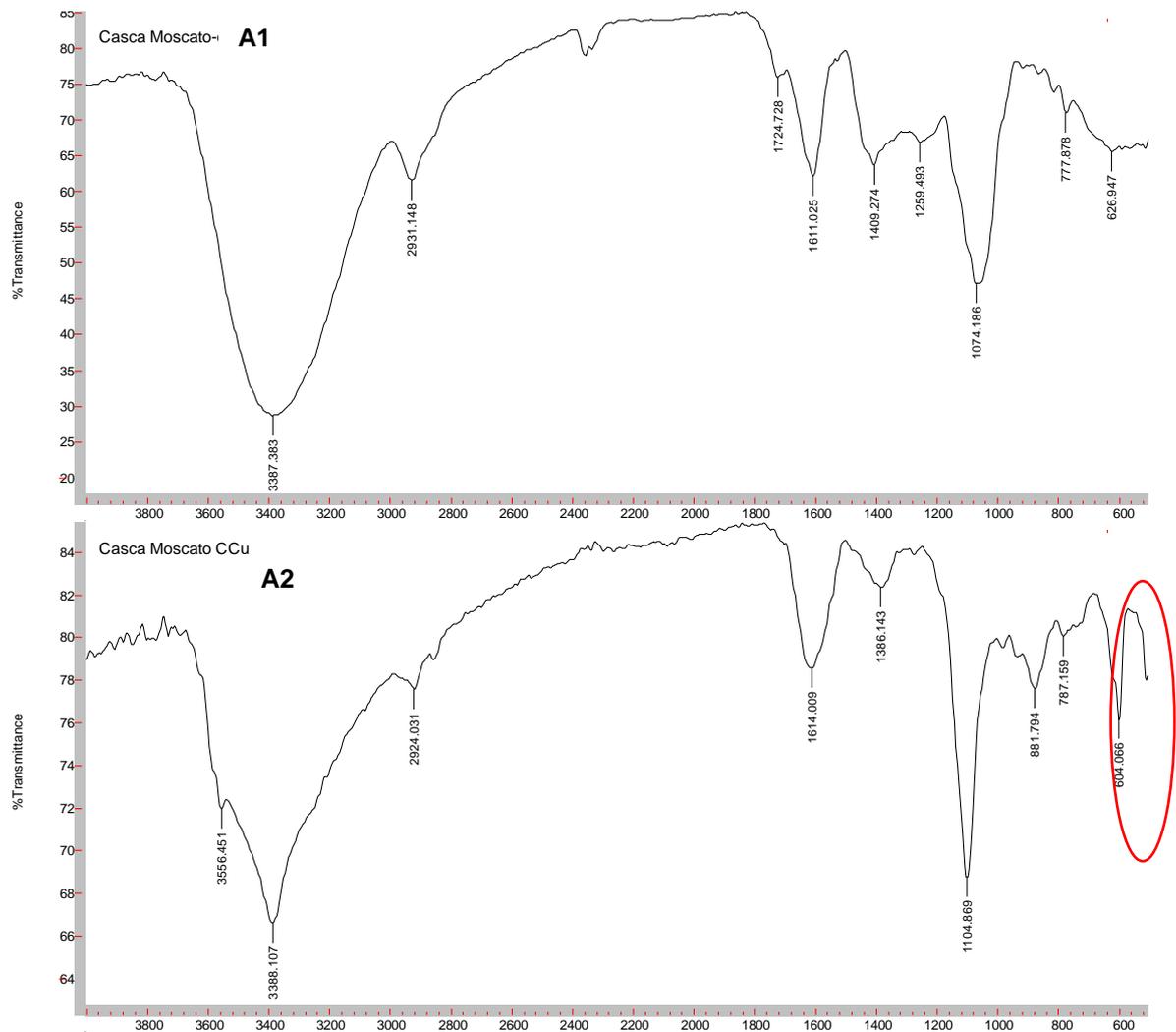


Figura 70. Espectros de Infravermelho do extrato acetona 70% da casca da uva Moscato (A1) e do complexo extrato casca moscato-cobre (A2).

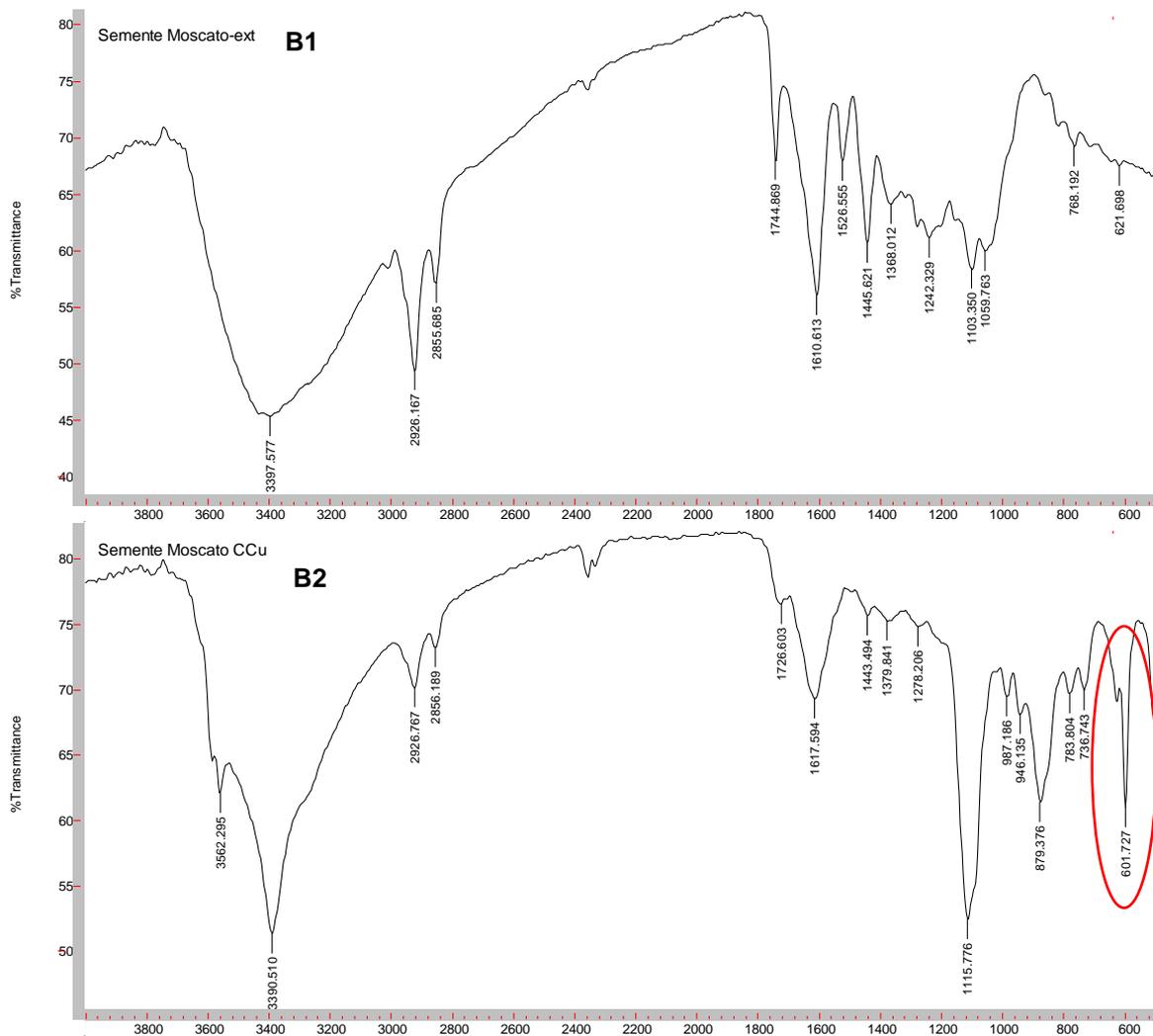


Figura 71. Espectros de Infravermelho do extrato etanólico da semente uva Moscato (B1) e do complexo extrato semente Moscato-cobre (B2).

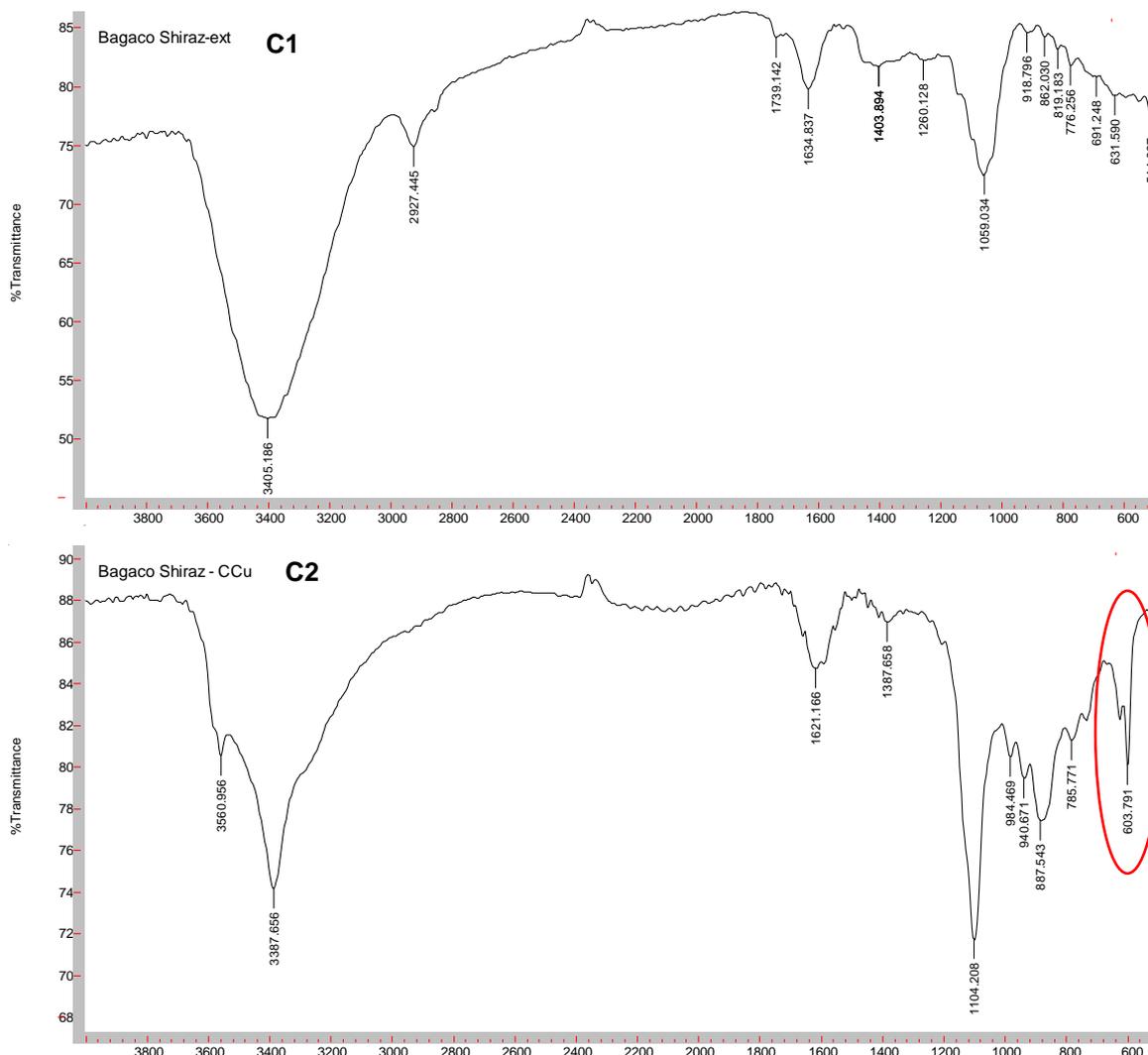


Figura 72. Espectros de Infravermelho do extrato etanol 80% bagaço uva Shiraz (C1) e do complexo bagaço uva Shiraz-cobre (C2).

Ao compararmos os espectros de MALDI-TOF dos extratos Moscato casca acetona 70%, Moscato semente etanol e Shiraz bagaço etanol 80% (Figura 73) com seus respectivos complexos resíduo uva-cobre (Figura 74) é possível observar a ausência dos sinais dos íons das proantocianidinas e das antocianinas identificadas, principalmente as de maiores pesos moleculares. A formação do complexo com cobre, provavelmente dificulta a ionização dessas substâncias.

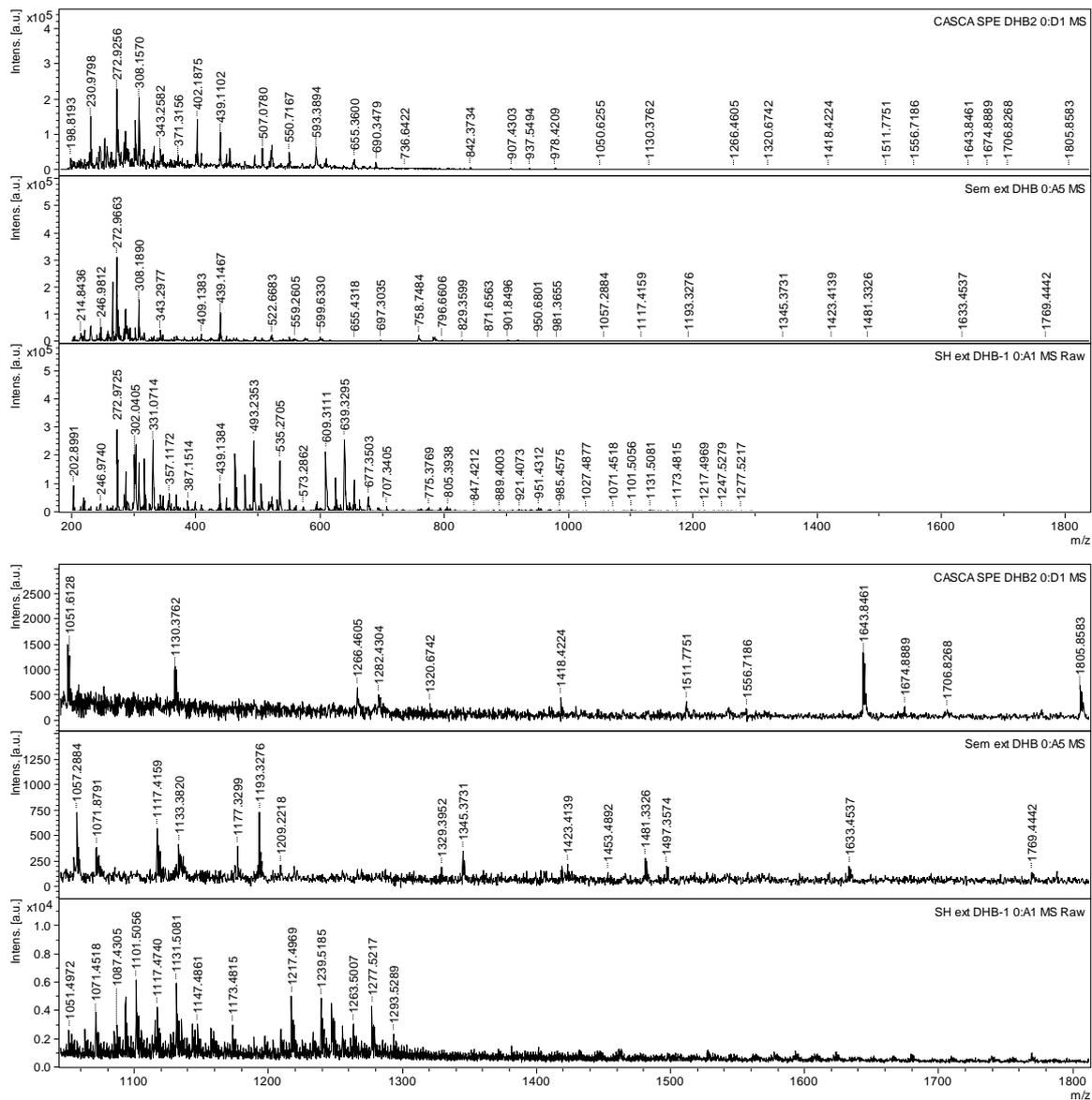


Figura 73. Espectro de MALDI-TOF-MS dos extratos Moscato casca acetona 70%, Moscato semente etanol e Shiraz bagaço etanol 80%, respectivamente.

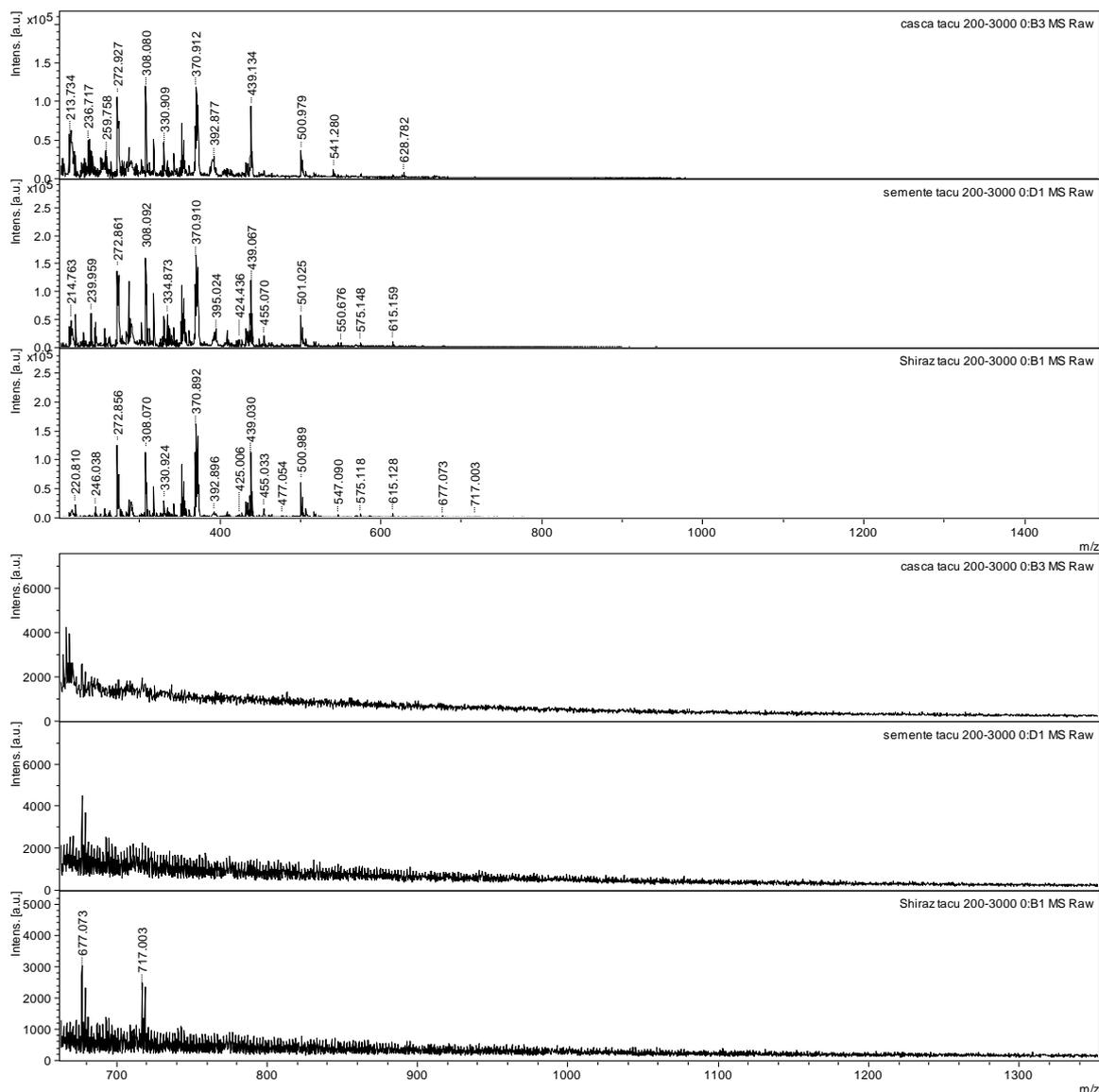


Figura 74. Espectro de MALDI-TOF-MS dos complexos Cu-Moscato casca acetona 70%, Cu-Moscato semente etanol e Cu-Shiraz bagaço etanol 80%, respectivamente.

5.8. Ensaio de toxicidade dos extratos das uvas e complexos resíduo uva-cobre frente ao microcrustáceo *Artemia salina*

Estudos de toxicidade auxiliam na triagem de uma grande variedade de compostos com atividade biológica para definir seu potencial de aplicação terapêutica mensurando a toxicidade apresentada dos possíveis futuros fármacos

(CARBALLO et al., 2002). Valores de CL_{50} acima 1000 $\mu\text{g/mL}$, são considerados atóxicos, baixa toxicidade quando a CL_{50} for superior a 500 $\mu\text{g/mL}$; moderada para CL_{50} entre 100 a 500 $\mu\text{g/mL}$ e muito tóxico quando a CL_{50} for inferior a 100 $\mu\text{g/mL}$ (MEYER et al., 1982; AMARANTE, 2011).

Observando os dados verificou-se que os extratos da semente da uva Moscato e do bagaço da Shiraz não apresentaram toxicidade frente a *A. salina* e o extrato da casca Moscato apresentou baixa atividade $CL_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$. Ao analisar os complexos cobre-resíduos observa-se que houve uma potencialidade da atividade ao se comparar com os extratos brutos, os três complexos testados foram considerados muito tóxicos, frente a *A. salina*, com destaque para o complexo obtido do extrato da casca Moscato com CL_{50} 24,11 $\mu\text{g/mL}$. O padrão de Cu metálico também foi testado e apresentou CL_{50} 0,82 $\mu\text{g/mL}$, confirmando que a toxidade dos complexos. Os testes foram realizados nos tempos de 24, 48 e 72h, no entanto não foi possível calcular a CL_{50} nestes tempos, pois as *Artemias* não sobreviveram na maioria das concentrações testadas impossibilitando o cálculo.

A Tabela 12 apresenta os valores de CL_{50} obtidos para os extratos da casca (acetona 70%) e da semente (EtOH) da Uva Moscato e do bagaço (EtOH 80%) da uva Shiraz, bem como, para os complexos destes extratos.

Tabela 12. Toxicidade dos extratos e complexos frente teste com *Artemia salina* no tempo de 24h

Amostra	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	R^2	P
Semente Moscato (ext. etanólico)	1157,0	0,9607	0,0199
Casca Moscato (ext. acetona 70%)	687,3	0,9957	0,0418
Bagaço Shiraz (ext. etanol 80%)	2443,0	0,9744	0,0017
Cu-SM	46,23	0,9331	0,0075
Cu-CM	24,11	0,7868	0,0448
Cu-BSh	31,89	0,8530	0,0251
Cu padrão	0,82	0,9280	0,0367

5.9. Análise do teor de cobre por espectroscopia de absorção atômica

Como o cobre é o principal biocida utilizado neste experimento é de suma importância avaliar seu comportamento em relação a sua liberação durante o processo de investigação para o meio aquoso, que consiste de água marinha. Este processo de liberação do biocida foi avaliado com base no teor de cobre. Foram avaliados os complexos resíduos uva-cobre da semente (Cu-SM) e casca do cultivar Moscato (Cu-CM) e do bagaço da Shiraz (Cu-BSh). Os teores de cobre dos derivados foram de $34,55 \pm 2,50\%$, $38,58 \pm 1,11\%$ e $39,32 \pm 0,81\%$ de cobre, respectivamente. Esses dados confirmam que ocorreu a formação do complexo cobre-polifenóis, principalmente taninos, presentes nos extratos utilizados. Esses dados mostram que tanto o resíduo da uva Moscato (semente e casca), quanto da uva Shiraz (bagaço) apresentaram complexação semelhante com o cobre, tendo em vista que a diferença do teor de cobre, entre eles foram pequenas.

A água do mar que foi utilizada nos testes de *Artemia* com as amostras dos complexos também foi utilizada para avaliar o teor de cobre liberado durante o teste. O teste avaliou o teor de Cu livre na água nos tempos de 24h, 48h e 72h de cada complexo. Nota-se que houve uma diminuição do teor de cobre com o aumento do tempo de exposição do complexo com a água do mar (Figura 75). O complexo resíduo uva-cobre da casca do cultivar Moscato (Cu-CM) apresentou maior liberação de cobre durante todo o período de análise, seguido pelo obtido do bagaço da uva Shiraz. Esses resultados corroboram com o teste de toxicidade com *Artemia*, onde se observou que o Cu-CM foi quem apresentou menor CL_{50} , seguida pelo Cu-BSh. Esses dados sugerem que a toxicidade, está de fato, relacionada com a liberação do Cu, que é um biocida com atividade anti-incrustante conhecida.

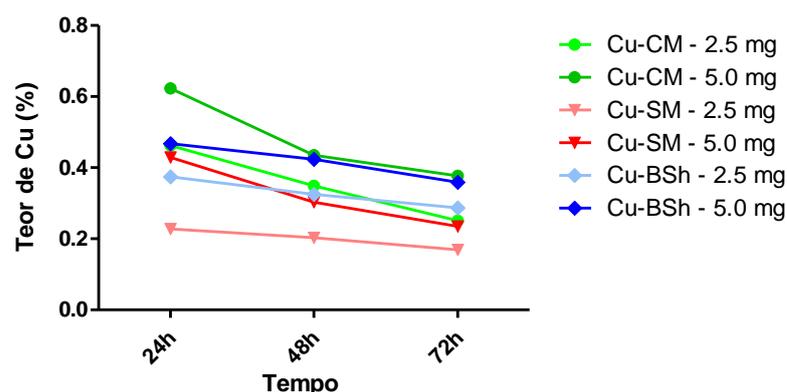


Figura 75. Teor de Cu liberado para a água do mar, tempo de análise 24, 48 e 72h.

5.10. Avaliação do poder anti-incrustante em ambiente marinho (teste de imersão)

Para a avaliação da eficiência anti-incrustante dos revestimentos obtidos, as placas revestidas com a tinta, contendo o resíduo-cobre, preparadas no laboratório foram imersas em ambiente marinho. Além das tintas obtidas dos resíduos, foram testados também placas sem aditivos anti-incrustantes e placas contendo complexo de tanino comercial por ser conhecido pela atividade anti-incrustante (NOOR IDORA et al., 2015). Foram preparadas 6 placas de cada amostra para serem testadas. O teste foi realizado no período de 4 semanas, embora seja um tempo curto, é o suficiente para avaliar o potencial anti-incrustante das placas, pois o local de imersão não é de água corrente, o que o torna muito propício a formação de cracas. A Figura 76 e 77 mostra as placas na primeira e quarta semana do teste de imersão. A placa que recebeu tinta sem tratamento anti-incrustante foi utilizada como Branco. Após uma semana de teste, apenas o branco começa a apresentar formação de incrustações. Foi possível observar que houve uma formação acentuada de

incrustação de cracas, após o período de 4 semanas. É possível observar a diferença entre as placas pintadas com a base da tinta sem o aditivo anti-incrustante (branco) e as placas pintadas com a formulação anti-incrustante. Foram testadas também placas pintadas com tinta contendo complexo obtido de tanino comercial.

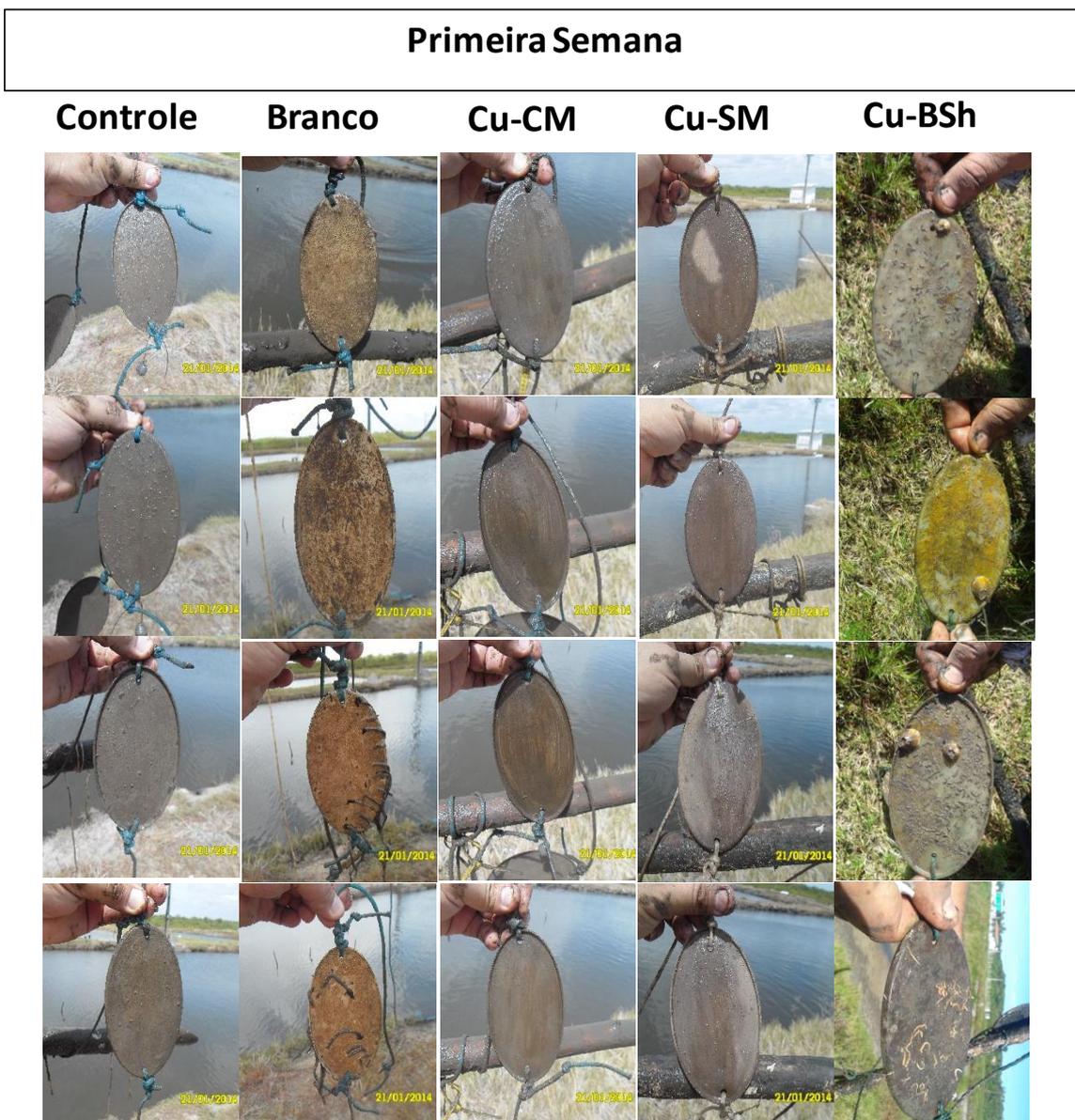


Figura 76. Comportamento anti-incrustante nos testes de imersão do Branco, Controle positivo e tintas contendo complexo de resíduo uva-cobre após 1 semana de imersão.

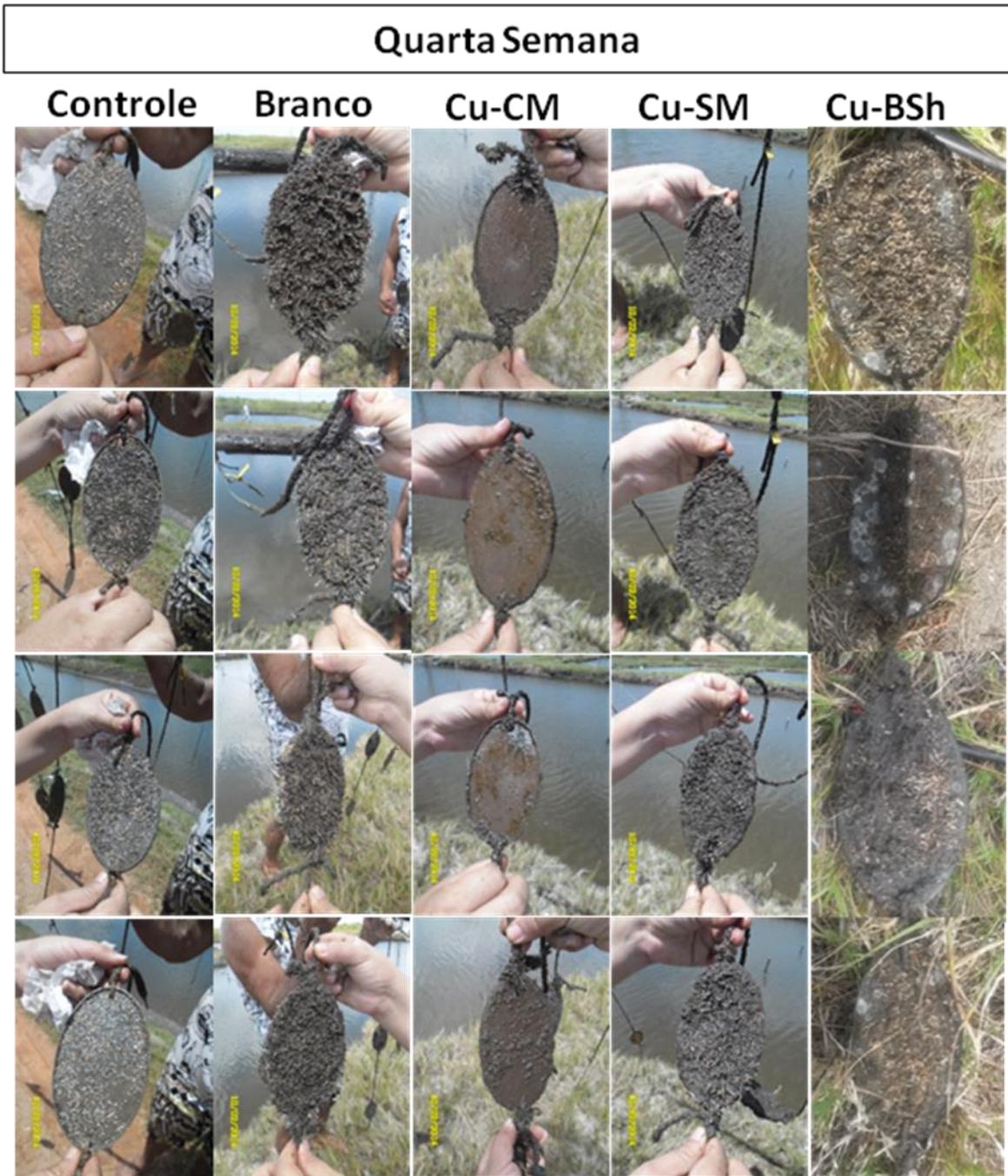


Figura 77. Comportamento anti-incrustante nos testes de imersão do Branco, Controle positivo e tintas contendo complexo de resíduo uva-cobre após 4 semanas de imersão.

A atividade de características anti-incrustante dos complexos testados foi investigada usando o aumento da massa da placa, devido ao peso da acumulo de incrustação biológica. O peso de incrustação biológica foi medido nas placas imerso na profundidade de 50 cm e em 100 cm.

Os resultados apresentados na Figura 78, deixa evidente que, sem o complexo resíduo uva/cobre o peso da massa aumentou significativamente em comparação com o controle. O complexo resíduo uva/cobre das sementes da uva Moscato e o bagaço da uva Shiraz foram os mais ativos. Estes extratos apresentaram atividade anti-incrustante ainda melhor que o tanato de cobre que já é conhecido na literatura por sua ação anti-incrustante (CASTRO et al., 2011). Esses resultados sugerem que os fenólicos restantes no bagaço de uva têm um elevado potencial na prevenção da formação e do crescimento de incrustação biológica sobre a placa. Derivado de taninos a partir de espécies vegetais já são conhecidos como anti-incrustantes. No entanto, complexos obtidos com resíduos de uvas e principalmente derivados com antocianinas não há nenhum relato.

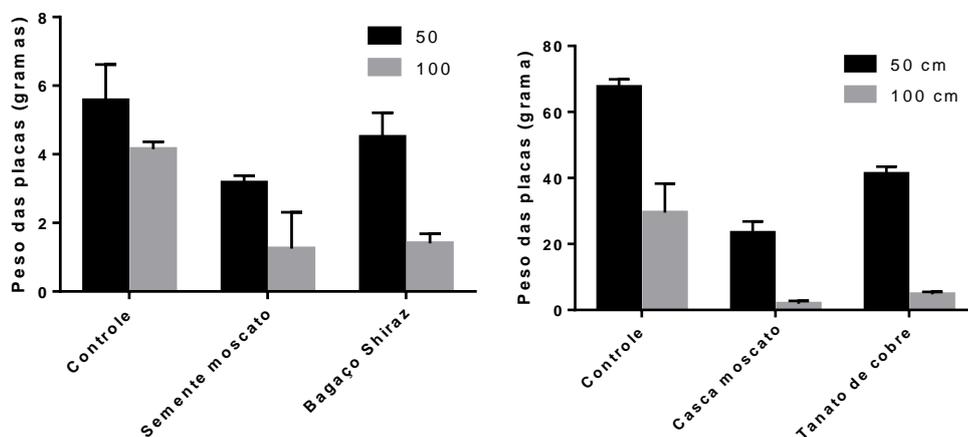


Figura 78. Aumento da massa de incrustação em placas imersas no teste de imersão em profundidades de 50 cm e 100 cm.

Este resultado mostra a eficácia da tinta desenvolvida e apresentada no presente trabalho. Os resultados mostram também que as superfícies que não

contém nenhum tipo de revestimento anti-incrustante protetor quando imersas em ambiente marinho estão sujeitas a incrustações em períodos não muito extensos.

O presente trabalho resultou no depósito da patente intitulado “Tinta anti-incrustante contendo resíduos da indústria vinícola e processo de produção”, sob o número BR102015028182-0. Na literatura brasileira de patentes não há registro de componente ativo para tintas anti-incrustantes similares ao aqui apresentado, utilizando resíduo industrial. A patente BR 102012001393 relata um agente anti-incrustante compreendendo taninos (do tipo condensado e hidrolisável), tanato de cobre (TC) ou tanato de ferro obtidos a partir de taninos de Acácia, Pinheiro, Castanheira, Tara e outros, porém não há porcentagem nem a caracterização dos taninos retirados das espécies vegetais utilizados na tinta.

O grande problema da utilização de taninos é o acesso à fonte natural de onde eles podem ser extraídos. Alguns utilizam taninos extraídos de cascas de árvores adultas, o que exige dano, em certa extensão, ao vegetal. A presente proposta sugere a utilização de extratos do bagaço da uva (resíduo) oriundo do processo da fabricação do vinho em vinícolas da Região do Vale do São Francisco, que são ricos em fenólicos e não estão ainda inseridos em nenhuma cadeia produtiva de aproveitamento de resíduos, até onde temos conhecimento.

É importante salientar, que os íons cobre não são eficientes contra todos os tipos de bioincrustantes. Além disso, a taxa de liberação de cobre é dependente de parâmetros como tipo de resina, natureza da água do mar e velocidade de difusão. Estudos mostram que a carga de cobre presente no ecossistema marinho oriunda de tintas *antifouling* é aproximadamente 3.000 t/ano, enquanto que o valor liberado deste mesmo elemento oriundo do desgaste de fontes naturais é de aproximadamente 250.000 t/ano (ALMEIDA et al., 2007). Porém, é importante salientar que altas concentrações de cobre podem ser prejudiciais a algas e outros organismos marinhos (KATRANITSAS et al., 2003; INOUE, et al., 2004).

Com base nos dados obtidos, podemos afirmar que o pigmento do complexo resíduo-cobre, produzido à base de um extrato de resíduo vegetal, é uma alternativa de utilização em formulações anti-incrustantes, tendo em vista, que essas formulações possuem menor concentração de cobre em comparação às tintas anticracas convencionais. Esse produto caracteriza o aproveitamento e agregação de valor aos resíduos vinícolas da Região do Vale do São Francisco. Além disso, as

vinícolas e as microempresas podem agregar valor comercial aos resíduos produzidos com um impacto na economia local e geração de novos empregos. É um novo produto tecnológico (tinta) com caráter inovador e ambientalmente amigável, atendendo aos três requisitos da sustentabilidade: o econômico, o social e o ecológico.

6. CONCLUSÕES

Os bagaços das cultivares Moscato e Shiraz apresentaram teores elevados de fenólicos. Sendo assim, esses resíduos surgem como uma fonte de baixo custo para obtenção de compostos fenólicos, com potencial aplicação na indústria em geral.

A análise por MALDI-TOF do extrato hidroalcoólico do resíduo do cultivar Shiraz possibilitou a identificação de 54 antocianinas, desde as monoglicosiladas até as mais complexas como as piranoantocianinas. Além disso, foram isolados e identificadas 2 flavonoides (isoquercetina e isoraminetina-3-*O*- β -*D*-glicosídeo) e 4 antocianinas (mistura de peonidina-3-*O*- β -*D*-glicosídeo e malvidina-3-*O*- β -*D*-glicosídeo e mistura de peonidina-3-*O*- β -*D*-(6-*O*-*p*-cumaroil)-glicosídeo e malvidina-3-*O*- β -*D*-(6-*O*-*p*-cumaroil)-glicosídeo). Foram identificados (MALDI-TOF), do extrato etanólico da semente da uva Moscato proantocianidinas com grau de polimerização variando de 1-6, com unidade de (epi)catequina e (epi)galocatequina. Na análise por UPLC-DAD-qTOF-MS foram identificadas monômero, dímero, trímero e tetrâmero da (epi)catequina. Assim como nas sementes também foram identificadas proantocianidinas nas cascas da uva Moscato. Foram identificadas trimeros de (epi)afzelequina e oligômeros de (epi)catequina e afzelequina.

No teste de *Artemia salina* os extratos da semente e casca da uva Moscato e do bagaço da Shiraz não apresentaram toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. Em contrapartida os complexos cobre-resíduos foram considerados muito tóxicos, essa potencialidade do complexo, observada pode ser atribuída à presença do cobre.

As análises do teste de imersão demonstram que os revestimentos contendo o complexo de resíduo-cobre apresentam eficiência superior à tinta contendo complexo obtido de tanino comercial, durante o mesmo tempo de imersão. Os extratos semente da uva moscato e bagaço da uva Shiraz foram os que apresentaram o melhor resultado no teste de imersão.

As tintas anti-incrustante produzidas com os extratos estudados nesse trabalho caracteriza o aproveitamento e agregação de valor aos resíduos vinícolas da Região do Vale do São Francisco.

7. REFERÊNCIAS

ABARZUA S.; JAKUBOWSKI S. Biotechnological investigation for the prevention of biofouling. I. Biological and biochemical principles for the prevention of biofouling. **Marine Ecology Progress Series**, 123: 301-312, 1995.

ABE, L. T.; DA MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinífera* L. **Ciências e Tecnologia do Alimento**, 27: 394-400, 2007.

ADAMS, D.O. Phenolics and Ripening in Grape Berries. **American Journal of Enology and Viticulture**, 57: 249-256, 2006.

ALBANIS, T. A.; LAMBROPOULOU, D. A.; SAKKAS, V. A.; KONSTANTINOY, I. K. Antifouling paint booster biocide contamination in Greek marine sediments. **Chemosphere**, 48: 475-485, 2002.

ALCALDE-EON, C.; ESCRIBANO-BAILÓN, M. T.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C. Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing: a comprehensive study. **Analytica Chimica Acta**, 563: 238–254, 2006.

ALCALDE-EON, C.; ESCRIBANO-BAILÓN, M.T.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J.C. Separation of pyranoanthocyanins from red wine by column chromatography. **Analytica Chimica Acta**, 513: 305–318, 2004.

ALÉN-RUIZ, F.; GARCÍA-FALCÓN, M.S.; PÉREZ-LAMELA, M.C.; MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; SIMAL-GÁNDARA, J. Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines. **Food Chemistry**, 113: 53–60, 2009.

ALMEIDA, E.; DIAMANTINO, T.C.; DE SOUSA, O. Marine paints: The particular case of antifouling paints. **Progress in Organic Coatings**, 59: 2-20, 2007.

AMARANTE, C. B.; MÜLLER, A.H.; PÓVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazônica**, 41: 431-434, 2011.

ANDRADE, J. M.; FERREIRA, C. A.; PREVEDELLO, A. L. A.; OLIVEIRA, L.S. Síntese e caracterização de pigmento antifouling não convencional a base de tanino. **19º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais – CBECiMat**, 2010.

ANDRADE, P. B.; OLIVEIRA, B. M.; SEABRA, R. M.; FERREIRA, M. A.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C. Analysis of phenolic compounds in Spanish Albariño and Portuguese Alvarinho and Loureiro wines by capillary zone electrophoresis and high-performance liquid chromatography. **Electrophoresis**, 22: 1568-1572, 2001.

ARDREY, R. E. **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction**. Wiley, ISBN 978-0-471-49801-8, England. 2003.

ARMSTRONG, E.; BOYD, K. G.; PISACANE, A.; PEPPIATT, C. J.; BURGESS, J. G. Marine microbial natural products in antifouling coatings. **Biofouling**, 16: 215-224, 2000.

ARVANITOYANNIS, I. S.; LADAS, D.; MAVROMATIS, A. Potential uses and applications of treated wine waste: a review. International. **Journal of Food Science and Technology**, 41: 475-487, 2006.

AZEVEDO, D. D. A.; GERCHON, E.; REIS, E. O. D. Monitoring of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in water from Paraíba do Sul River, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 15: 292-299, 2004.

BABBAR, N.; OBEROI, H. S.; UPPAL, D. S.; PATIL, R. T. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. **Food Research International**, 44: 391-396, 2011.

BAGCHI, D.; BAGCHI, M; STOHS, S. J.; DAS, D. K.; RAY, S. D.; KUSZYNSKI, C. A.; JOSHI, S. S.; PRUESS, H. G. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. **Toxicology**, 148: 187–197, 2000.

BAKKER, J.; TIMBERLAKE, C.F. Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45: 35–43, 1997.

BAVARESCO, L.; MATTIVI, F.; DE ROSSO, M.; FLAMINI, R. Effects of elicitors, viticultural factors, and enological practices on resveratrol and stilbenes in grapevine and wine. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 12: 1366–1381, 2012.

BELLOTTI, N.; DEL AMO, B.; ROMAGNOLI, R. Tara tannin a natural product with antifouling coating application. **Progress in Organic Coatings**, 74: 411-417, 2012.

BERTELLI, A. A.; GIOVANNINI, L.; GIANNESI, D.; MIGLIORI, M.; BERNINI, W.; FREGONI, M.; BERTELLI, A. Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. **International Journal of Tissue Reactions**, 17: 1-3, 1995.

BHAT, K. P.; KOSMEDER, J. W.; PEZZUTO, J. M. Biological effects of resveratrol. **Antioxidants and Redox Signaling**, 3: 1041-1064, 2001.

BOIDO, C.; ALCALDE-EON, F.; CARRAU, E.; DELLACASSA, E.; RIVAS-GONZALO, J. C. Aging effect on the pigment composition and color of *Vitis vinifera* L. cv. Tannat wines. Contribution of the main pigment families to wine color. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54: 6692–6704, 2006.

BONILLA, F.; MAYEN, M.; MERIDA, J.; MEDINA, M. Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. **Food Chemistry**, 66: 209-215, 1999.

BORDIGA, M.; TRAVAGLIA, F.; LOCATELLI, M.; COÏSSON, J. D.; ARLORIO, M. Characterisation of polymeric skin and seed proanthocyanidins during ripening in six *Vitis vinifera* L. cv. **Food Chemistry**, 127: 180-187, 2011.

BOUSSETTA, N.; VOROBIEV, E.; DELOISON, V.; POCHEZ, F.; FALCIMAIGNE-CORDIN, A.; LANOISELLÉ, J.-L. Valorisation of grape pomace by the extraction of phenolic antioxidants: Application of high voltage electrical discharges. **Food Chemistry**, 128: 364-370, 2011.

BURGESS, J. G.; BOYD, K. G.; ARMSTRONG, E.; JIANG, Z.; YAN, L.; BERGGREN, M.; MAY, U.; PISACANE, T.; GRANMO, A.; ADAMS, D. R. The Development of a marine natural product-based antifouling paint. **Biofouling**, 19: 197-205, 2003.

CAMARGO, U. A. Uva para processamento, 2015. Embrapa. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/uva_para_processamento/arvore/CONT000g5f8cou802wx5ok0bb4szwyx060i6.html. Acesso em 01-09-2015.

CAMIRE, M. E.; CHAOVANALIKIT, A.; DOUGHERTY, M. P.; BRIGGS, J. Blueberry and grape anthocyanins as breakfast cereal colorants. **Journal of Food Science**, 67: 438–441, 2002.

CAMPOS L. M. A. S. **Obtenção de extratos de bagaço de uva Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*): Parâmetros de processo e modelagem matemática.** Dissertação (Mestrado Engenharia de alimentos) -Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis: p. 141, 2005.

CAMPOS, L. M. A. S.; LEIMANN, F. V.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology**, 99: 8413-8420, 2008.

CANALS, R.; LLAUDY, M.C.; VALLS, J.; CANALS, J.M.; ZAMORA, F. Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seeds of Tempranillo grapes at different stages of ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53: 4019–4025, 2005.

CARBALLO, J. L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z. L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M. D. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**, 2: 1, 2002.

CASASSA, L. F.; BOLCATO, E. A.; SARI, S. E. Chemical, chromatic, and sensory attributes of 6 red wines produced with prefermentative cold soak. **Food Chemistry**, 174: 110-118, 2015.

CASTANEDA-OVANDO, A.; DE LOURDES PACHECO-HERNÁNDEZ, M.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, 113: 859-871, 2009.

CASTANEDA-OVANDO, A.; SEDO, O.; HAVEL, J.; PACHECO, L.; GALÁN-VIDAL, C. A.; LÓPEZ, E. C. Identification of Anthocyanins in Red Grape, Plum and Capulin by MALDI-ToF MS. **Journal of the Mexican Chemical Society**, 56: 378-383, 2012.

CASTILLO-MUÑOZ, N.; GÓMEZ-ALONSO, S.; GARCÍA-ROMERO, E.; GÓMEZ, M. V.; VELDERS, A. H.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Flavonol 3- O-glycosides series of *Vitis vinifera* Cv. Petit Verdot red wine grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57: 209–219, 2009.

CASTILLO-MUÑOZ, N.; GÓMEZ-ALONSO, S.; GARCÍA-ROMERO, E.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55: 992–1002, 2007.

CASTRO, I. B.; WESTPHAL, E.; FILLMANN, G. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. **Química Nova**, 34: 1021-1031, 2011.

CATANEO, C.B.; CALIARI V.; GONZAGA L. V.; KUSKOSKI E. M.; FETT, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Seminário: Ciências Agrárias**, 29: 93-102, 2008.

CAVALCANTI, R. N.; SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview. **Food Research International**, 44: 499-509, 2011.

CHAMBERS, L. D.; STOKES, K. R.; WALSH, F. C.; WOOD, R. J. K. Modern approaches to marine antifouling coatings. **Surface and Coatings Technology**, 201: 3642-3652, 2006.

CHAMP, M. A. A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. **Science of the Total Environment**, 258: 21–71, 2000.

CHEYNIER, V.; RIGAUD, J. HPLC separation and characterization of flavonols in the skin of *Vitis vinifera* var. Cinsault. **American Journal of Enology and Viticulture**, 37: 248–252, 1986.

CHINNICI, F., SONNI, F., NATALI, N., GALASSI, S., & RIPONI, C. Colour features and pigment composition of Italian carbonic macerated red wines. **Food Chemistry**, 113: 651-657, 2009.

CICHEWICZ, R. H.; KOUZI, S. A.; HAMANN, M. T. Dimerization of resveratrol by the grapevine pathogen *Botrytis cinerea*. **Journal of Natural Products**, 63: 29–33, 2000.

CODEVASF - **Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba**,2014. <http://www.codevasf.gov.br/noticias/2014/rota-do-vinho-fortalece-turismo-gastronomico-no-vale-do-sao-francisco>.

CONDE, C.; SILVA, P.; FONTES, N.; DIAS, A.C.P.; TAVARES, R.M.; SOUSA, M.J.; AGASSE, A.; DELROT, S.; GERÓS, H. Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. **Ed. Global Science Book**, 1: 1-22, 2007.

COUNCIL, A. **Antifouling biocides in marinas: Measurement of copper concentrations and comparison to model predictions for eight Auckland sites**. 2012.

COWAN, M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, 12: 564 – 582, 1999.

CPFAC - **CURRENT PROTOCOLS IN FOOD ANALYTICAL CHEMISTRY**. Editora: John Wiley and Sons, Inc., Ronaldo E. Wrostad (Editor in Chief), 2006.

CRUZ, L.; TEIXEIRA, N.; SILVA, A.M.S.; MATEUS, N.; BORGES, J.; DE FREITAS, V. Role of vinylcatechin in the formation of pyranomalvidin-3-glucoside-(+)-catechin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56: 10980–10987, 2008.

DA GAMA, B. A. P.; CARVALHO, A. G. V.; WEIDNER, K.; SOARES, A. R.; COUTINHO, R.; FLEURY B.G.; TEIXEIRA, V. L.; PEREIRA, R. C. Antifouling activity of natural products from Brazilian seaweeds. **Botanica Marina**, 51: 191-201, 2008.

DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. **Biochemical Systematic and Ecology**, 27: 445-459, 1999.

DE FREITAS, V.; MATEUS, N. Formation of pyranoanthocyanins in red wines: A new and diverse class of anthocyanin derivatives. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 401: 1463–1473, 2011.

DE VILLIERS, A.; VANHOENACKER, G.; MAJEK, P.; SANDRA, P. Determination of anthocyanins in wine by direct injection liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry and classification of wines using discriminant analysis. **Journal of Chromatography A**, 1054: 195-204, 2004.

DEL LLAUDY, M. C.; CANALS, R.; CANALS, J. M.; ZAMORA, F. Influence of ripening stage and maceration length on the contribution of grape skins, seeds and stems to phenolic composition and astringency in wine-simulated macerations. **European Food Research and Technology**, 226: 337-344, 2008.

DELAZAR, A.; KHODAIE, L.; AFSHAR, J.; NAHAR, L.; SARKER, S. (2010). Isolation and free-radical-scavenging properties of cyanidin 3-O-glycosides from the fruits of *Ribes biebersteinii* Berl. **Acta Pharmaceutica**, 60: 1-11, 2010.

DELOIRE, A.; KRAEVA, E.; DAÍ, G.H.; RENAULT, A.S.; ROCHARD, J.; CHATELAIN, C.; CARBONNEAU, A.; ANDARY, C. Les mécanismes de défense de la vigne. Des utilisations possibles pour lutter contre les pathogènes. **Phytoma**, 510: 46-51, 1998.

DEMOLINER, A.; CALDAS, S. S.; COSTA, F. P.; GONÇALVES, F. F.; CLEMENTIN, R. M.; MILANI, M. R.; PRIMEL, E. G. Development and validation of a method using SPE and LC-ESI-MS-MS for the determination of multiple classes of pesticides and metabolites in water samples. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 21: 1424-1433, 2010.

DI LANDA, G., ANSANELLI, G., CICCOLI, R., & CREMISINI, C. Occurrence of antifouling paint booster biocides in selected harbors and marinas inside the Gulf of Napoli: a preliminary survey. **Marine pollution bulletin**, 52: 1541-1546, 2006.

DIAS, J. F. **Determinação dos conteúdos de resveratrol em vinhos tintos de duas regiões brasileiras**. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

DÍAZ, T. G.; MERÁS, I. D.; RODRÍGUEZ, D. A. Determination of resveratrol in wine by photochemically induced second-derivative fluorescence coupled with liquid–liquid extraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 387: 1999-2007, 2007.

DOLABELA, M. F. **Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti Trypanossoma cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas**, 1997.

DOS SANTOS, P. M.; SCHRIPSEMA, J.; KUSTER, R. Flavonoides O-glicosilados de Croton campestris St. Hill (*Euphorbiaceae*). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 15: 321-325, 2005.

DOWNEY, M. O.; HARVEY, J. S.; Robinson, S. P. The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, 10: 55-73, 2004.

DREISEWERD K. The desorption process in MALDI. **Chemical Reviews**, 103: 395–426, 2003.

EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J. Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. **Applied Spectroscopy Reviews**, 44: 210–230, 2009.

ES-SAFI, N. E.; GUYOT, S.; DUCROT, P. H. NMR, ESI/MS, and MALDI-TOF/MS analysis of pear juice polymeric proanthocyanidins with potent free radical scavenging activity. **Journal of agricultural and food chemistry**, 54: 6969-6977, 2006.

EVANS, S.M.; BIRCHENOUGH, A.C. & BRANCATO, M.S. The TBT Ban: Out of the Frying Pan into the Fire? **Marine Pollution Bulletin**, 40: 204-211, 2000.

FAMUYIWA, O.; OUGH, C. S. Grape pomace: possibilities as animal feed. **American Journal of Enology and Viticulture**, 33: 44-46, 1982.

FEI, H.; NA-NA, L.; LIN, M.; QIU-HONG, P.; JUN, W.; MALCOLM, J. R.; CHANG-QING, D. Anthocyanins and Their Variation in Red Wines II. Anthocyanin Derived Pigments and Their Color Evolution. **Molecules**, 17: 1483-1519, 2012.

FERNANDES, A.; BRÁS, N. F.; MATEUS, N.; DE FREITAS, V. A study of anthocyanin self-association by NMR spectroscopy. **New Journal of Chemistry**, 39: 2602-2611, 2015.

FERNANDEZ, M. A.; PINHEIRO, F. New approaches for monitoring the marine environment: the case of antifouling paints. **International Journal of Environment and Health**, 1: 427-448, 2007.

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. **Analytica Chimica Acta**, 701: 139–151, 2011.

FLAMINI, R. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: polyphenols. **Mass Spectrometry Reviews**, 22: 218–250, 2003.

FLAMINI, R. Recent Applications of Mass Spectrometry in the Study of Grape and Wine Polyphenols. **Hindawi Publishing Corporation ISRN Spectroscopy**, 2013: 2013.

FRAGA, C. G., GALLEANO, M.; VERSTRAETEN, S. V.; OTEIZA, P. I. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. **Molecular Aspects of Medicine** 31: 435-445, 2010.

FRANCIS, F. J. FEATURES-Anthocyanins and Betalains: Composition and Applications. **Cereal Foods World**, 45: 208-213, 2000.

FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; KINSELLA, J. E. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. **The Lancet**, 341: 1103–1104, 1993.

FRÉMONT, L.; BELGUENDOZ, L.; DELPAL, S. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. **Life Sciences**, 64: 2511–2521, 1999.

FRISON-NORRIE, S.; SPORNS, P. Identification and quantification of flavonol glycosides in almond seedcoats using MALDI-TOF MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50: 2782–2787, 2002.

FULCRAND, H.; BENABDELJALIL, C.; RIGAUD, J.; CHENYIER, V.; MOUTOUNET, M. A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. **Phytochemistry**, 47: 1401–1407, 1998.

GARCIA, E.; CHACÓN, J.L.; MARTÍNEZ, J.; IZQUIERDO, P.M. Changes in volatile compounds during ripening in grapes of Airén, Macabeo and Chardonnay white varieties grown in La Mancha region (Spain). **Food Science and Technology International**, 9: 33- 41, 2003.

GARCÍA-LOMILLO, J.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L.; PINO-GARCÍA, R. D.; RIVERO-PÉREZ, M. D.; MUÑIZ-RODRÍGUEZ, P. Antioxidant and Antimicrobial Properties of Wine Byproducts and Their Potential Uses in the Food Industry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62: 12595–12602, 2014.

GATIDOU, G.; THOMAIDIS, N. S.; ZHOU, J. L. Fate of Irgarol 1051, diuron and their main metabolites in two UK marine systems after restrictions in antifouling paints. **Environment international**, 33: 70-77, 2007.

GHAFOOR, K.; CHOI, Y. H.; JEON, J. Y.; JO, I. H. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57: 4988-4994, 2009.

GINJOM, I.; D'ARCY, B.; CAFFIN, N.; GIDLEY, M. Phenolic compound profiles in selected Queensland red wines at all stages of the wine-making process. **Food Chemistry**, 125: 823–834, 2011.

GIOVANNINI, E. **Produção de Uvas para Vinhos, Sucos e Mesa**. Porto Alegre: Renascença, 1999. 364 p.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry**, 2001.

GODOI, A. F. L.; FAVORETO, R.; SANTIAGO-SILVA, M. Contaminação ambiental por compostos organoestânicos. **Química Nova**, 26: 708-716, 2003.

GÓMEZ-ARIZA, J. L.; GARCÍA-BARRERA, T.; LORENZO, F. Anthocyanins profile as fingerprint of wines using atmospheric pressure photoionisation coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 570: 101–108, 2006.

GONZALEZ-MANZANO, S., RIVAS-GONZALO, J.C., AND SANTOS-BUELGA, C. Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. **Analytica Chimica Acta**, 513: 283-289, 2004.

GRANATO, D.; KATAYAMA, F. C. U.; DE CASTRO, I. A. Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. **Food Chemistry**, 129: 366-373, 2011.

GRANGEIRO, L. C.; LEAO, P. C. S.; SOARES, J. M. Caracterização fenológica e produtiva da variedade de uva Superior Seedless cultivada no Vale do São Francisco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 24: 552-554, 2002.

GUENDEZ, R.; KALLITHRAKA, S.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity. **Food Chemistry**, 89: 1-9, 2005b.

GUENDEZ, R.; KALLITHRAKA, S.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. An analytical survey of the polyphenols of seeds of varieties of grape (*Vitis vinifera* sp.) cultivated in Greece: implications for exploitation as a source of value-added phytochemicals. **Phytochemical Analysis**, 16: 17-23, 2005a.

GUERRA, C.C.; MANDELLI, F.; TONIETTO, J.; ZANUS, M. C.; CAMARGO, U.A. Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos – Variedades de Uva - Bento Gonçalves: **Embrapa Uva e Vinho (Documentos, 48)**: 17-25, 2009.

GUTIÉRREZ, I. H.; LORENZO, E. S. P.; ESPINOSA, A. V. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. **Food Chemistry**, 92: 269-283, 2005.

HARVEY, D. J. Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: an update for 2009–2010. **Mass Spectrometry Reviews**, 34: 268–422, 2015.

HAYASAKA, Y.; ASENSTORFER, R. E. Screening for potential pigments derived from anthocyanins in red wine using nano-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50: 756–761, 2002.

HELLIO, C.; MARECHAL, J.P.; DA GAMA, B.A.P.; PEREIRA, R.C.; CLARE, A.S. IN: HELLIO, C.; YEBRA D. (Eds.). **Advances in Marine AF Coatings and Technologies**, Woodhead Publishing, UK, pp. 572–622, 2009.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. John Wiley & Sons, ISBN 978-0-470-03310-4, West Sussex, UK. 2007.

HOGAN, S.; ZHANG, L.; LI, J.; SUN, S.; CANNING, C.; ZHOU, K. Antioxidant rich grape pomace extract suppresses postprandial hyperglycemia in diabetic mice by specifically inhibiting alpha-glucosidase. **Nutrition & metabolism**, 7: 1, 2010a.

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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58: 11250–11256, 2010b.

HOLLE, A.; HAASE, A.; KAYSER, M.; HOHNDORF, J. Optimizing UV laser focus profiles for improved MALDI performance. **Journal of Mass Spectrometry**, 41: 705–716, 2006.

HUNG, L. M.; CHEN, J. K.; HUANG, S. S.; LEE, R. S.; SU, M. J. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. **Cardiovascular Research**, 47: 549–555, 2000.

INOUE, M.; SUZUKI, A.; NOHARA, M.; KAN, H.; EDWARD, A.; KAWAHATA, H. Coral skeletal tin and copper concentrations at Pohnpei, Micronesia: possible index for marine pollution by toxic anti-biofouling paints. **Environmental Pollution**, 129: 399-407, 2004.

IVANOVA, B.; SPITELLER, M. Simultaneous quantitation of naturally occurring insecticides, acaricides, and piscicides in rapeseed oil by UV-MALDI mass spectrometry. **Journal of Food Measurement and Characterization**, 8: 15–28, 2014.

IVANOVA, V.; DÖRNYEI, Á.; STEFOVA, M.; STAFILOV, T.; VOJNOSKI, B.; KILÁR, F.; MÁRK, L. Rapid MALDI-TOF-MS detection of anthocyanins in wine and grape using different matrices. **Food Analytical Methods**, 4: 108–115, 2011.

JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G. O.; SLOWING, K. V.; THOMAS, C. F.; BEECHER, C. W.; FONG, H. H.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; MEHTA, R. G.; MOON, R. C.; PEZZUTO, J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, 275: 218–220, 1997.

JARA-PALACIOS, M. J.; HERNANZ, D.; GONZÁLEZ-MANZANO, S.; SANTOS-BUELGA, C.; ESCUDERO-GILETE, M. L.; HEREDIA, F. J. Detailed phenolic composition of white grape by-products by RRLC/MS and measurement of the antioxidant activity. **Talanta**, 125: 51–57, 2014.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. **Food Chemistry**, 73: 285-290, 2001.

JEFFERY, D. W.; MERCURIO, M. D.; HERDERICH, M. J.; HAYASAKA, Y.; SMITH, P. A. Rapid isolation of red wine polymeric polyphenols by solid-phase extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56: 2571–2580, 2008.

JENSEN, J. S.; DEMIRAY, S.; EGEBO, M.; MEYER, A. S.; 2008: Prediction of wine color attributes from the phenolic profiles of red grapes (*Vitis vinifera*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56: 1105-1115, 2008.

JOHNSON A.; CAREW E.; SLOMAN K.A. The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, 84: 431-438, 2007.

JORDHEIM, M.; FOSSEN, T.; ANDERSEN, Ø. M. Preparative isolation and NMR characterization of carboxypyrananthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54: 3572-3577, 2006.

KALINOWSKA, M.; LADERIERE, B.; CHAMPAGNE, P.; KOWCZYK-SADOWY, M.; LEWANDOWSKI, W. Mn (II), Cu (II) and Cd (II) *p*-coumarates: FT-IR, FT-Raman, ¹H and ¹³C NMR and thermogravimetric studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 103: 264-271, 2013.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical chemistry**, 60: 2299-2301, 1988.

KATRANITSAS A.; CASTRITSI-CATHARIOS J.; PERSOONE G. The effect of a copper-based antifouling paint on mortality and enzymatic activity of non-target marine organism. **Marine Pollution Bulletin**, 46: 1491-1494, 2003.

KAUFMANN, R.; WINGERATH, T.; KIRSCH, D.; STAHL, W.; SIES, H. Analysis of carotenoids and carotenol fatty acid esters by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and MALDI post-source-decay mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, 238: 117–128, 1996.

KAZUMA, K.; NODA, N.; SUZUKI, M. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. **Phytochemistry**, 62: 229-237, 2003.

KENNEDY, J.A.; SAUCIER, C.; GLORIES, Y. Grapes and wine phenolics: History and perspective. **American Journal of Enology and Viticulture**, 57: 239-248, 2006.

KETATA, I.; DENIER, X.; HAMZA-CHAFFAI, A.; MINIER, C. Endocrine-related reproductive effects in molluscs. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology**, 147: 261-270, 2008.

KNOCHENMUSS, R.; ZENOBI, R. MALDI ionization: The role of in-plume processes. **Chemical Reviews**, 103: 441–452, 2003.

KNOWLES, E.; WHITE, T. The Protection of Metals with Tannins. **Journal of the Oil and Colour Chemist's Association**, 41: 10-23, 1958.

KY, I.; TEISSEDE, P.-L. Characterisation of Mediterranean Grape Pomace Seed and Skin Extracts: Polyphenolic Content and Antioxidant Activity. **Molecules**, 20: 2190-2207, 2015.

LABARBE, B.; CHEYNIER, V.; BROSSAUD, F.; SOUQUET, J.-M.; MOUTOUNET, M. Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47: 2719-2723, 1999.

LANDETE, J. M. Updated Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism, and Health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 52: 936-948, 2012.

LARANJINHA, J. Translation of Chemical Properties of Polyphenols into Biological Activity with Impact on Human Health. **Recent Advances in Polyphenol Research** 2: 269-282, 2010.

LEÃO, P.C.S. et al. Principais cultivares. In: SOARES, J.M.; LEÃO, P.C.S. **A vitivinicultura no semiárido brasileiro**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Petrolina: Embrapa Semiárido, Cap. 5, 151-214, 2009.

LEE, J. H.; KANG, N. S.; SHIN, S. O.; SHIN, S. H.; LIM, S. G.; SUH, D. Y.; BAEK, I. Y.; PARK, K. Y.; HA, T. J. Characterisation of anthocyanins in the black soybean (*Glycine max* L.) by HPLC-DAD-ESI/MS analysis. **Food Chemistry**, 112: 226-231, 2009.

LEE, J.; KENNEDY, J. A.; DEVLIN, C.; REDHEAD, M.; RENNAKER, C. Effect of early seed removal during fermentation on proanthocyanidin extraction in red wine: A commercial production example. **Food Chemistry**, 107: 1270-1273, 2008.

LEE, Y. S.; LEE, H. S.; SHIN, K. H.; KIM, B. K.; LEE, S. Constituents of the halophyte *Salicornia herbácea*. **Archives of Pharmacal Research**, 10:1034-1036, 2004.

LINGUA, M. S.; FABANI, M. P.; WUNDERLIN, D. A.; BARONI, M. V. From grape to wine: Changes in phenolic composition and its influence on antioxidant activity. **Food Chemistry**, 208: 228-238, 2016a.

LINGUA, M. S.; FABANI, M. P.; WUNDERLIN, D. A.; BARONI, M. V. In vivo antioxidant activity of grape, pomace and wine from three red varieties grown in Argentina: Its relationship to phenolic profile. **Journal of Functional Foods**, 20: 332-345, 2016b.

MABRY, T.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. Springer Science & Business Media, 2012.

MACZ-POP, G. A.; RIVAS-GONZALO, J. C.; PÉREZ-ALONSO, J. J.; GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M. Natural occurrence of free anthocyanin aglycones in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, 94: 448-456, 2006.

MAIER, T.; SCHIEBER, A.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R. Residues of grape (*Vitis vinífera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, 112: 551–559, 2009.

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

MALLACRIDA, S. R.; MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **CEPPA**, 24: 59-82, 2006.

MARCZAK, L.; KACHLICKI, P.; KOZNIEWSKI, P.; SKIRYCZ, A.; KRAJEWSKI, P.; STOBIECKI, M. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry monitoring of anthocyanins in extracts from *Arabidopsis thaliana* leaves. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 22: 3949–3956, 2008.

MARTINS, T. L.; VARGAS, V. M. F. Riscos à biota aquática pelo uso de tintas anti-incrustantes nos cascos de embarcações. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, 8: 1-11, 2013.

MATEUS, N.; SILVA, A.M.S.; VERCAUTEREN, J.; DE FREITAS, V. Occurrence of anthocyanin-derived pigments in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49: 4836–4840, 2001.

MAY, L. A.; TOURKINA, E.; HOFFMAN, S. R.; DIX, T. A. Detection and quantitation of curcumin in mouse lung cell cultures by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, 337: 62–69, 2005.

MAZZUCA, P.; FERRANTI, P.; PICARIELLO, G.; CHIANESE, L.; ADDEO, F. Mass spectrometry in the study of anthocyanins and their derivatives: Differentiation of *Vitis vinifera* and hybrid grapes by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, 40: 83–90, 2005.

MEDEIROS, H. E.; GAMA, B. A. P. D.; GALLERANI, G. Antifouling activity of seaweed extracts from Guarujá, Sao Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, 55: 257-264, 2007.

MELLO L. M. R. Produção e Comercialização de Uvas e Vinhos. Panorama 2002. Embrapa. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/artigos.html>, acessado em 10/12/2014.

MELLO, L. M. R. **Desempenho da vitivinicultura brasileira em 2015**. Embrapa. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/9952204/artigo-desempenho-da-vitivinicultura-brasileira-em-2015>). Acesso em 12-06-2016.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAN, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; AUGHLIN, J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**, 45: 31-34, 1982.

MOLINO P. J.; WETHERBEE R. The biology of biofouling diatoms and their role in the development of microbial slimes. **Biofouling**, 24: 365–379, 2008.

MOLINO, P. J.; CHILDS, S.; HUBBARD, M. R.; CAREY, J. M.; BURGMAN, M. A.; WETHERBEE, R. Development of the primary bacterial microfouling layer on antifouling and fouling release coatings in temperate and tropical environments in Eastern Australia. **Biofouling**, 25: 149-162, 2009.

MONRAD, J. K.; HOWARD, L. R.; KING, J. W.; SRINIVAS, K.; MAUROMOUSTAKOS, A. Subcritical solvent extraction of anthocyanins from dried red grape pomace. **Journal of agricultural and food chemistry**, 58: 2862-2868, 2010.

MORATA, A.; CALDERÓN, F.; GONZÁLEZ, M.C.; GÓMEZ-CORDOVÉS, M.C.; SUÁREZ, J.A. Formation of the highly stable pyranoanthocyanins (vitisins A and B) in red wines by the addition of pyruvic acid and acetaldehyde. **Food Chemistry**, 100: 1144–1152, 2007.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, 72: 145-171, 2001.

MUKHERJEE, A.; RAO, K. V. M.; RAMESH, U. S. Predicted concentrations of biocides from antifouling paints in Visakhapatnam Harbour. **Journal of environmental management**, 90: S51-S59, 2009.

NAVE, F.; TEIXEIRA, N.; MATEUS, N.; DE FREITAS, V. Hemisynthesis and structural characterization of flavanol-(4,8)-vitisins by mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 24:1964–1970, 2010.

NEBOT E.; CASANUEVA J. F.; CASANUEVA T.; SALES D. Model for fouling deposition on power plant steam condensers cooled with seawater: Effect of water velocity and tube material. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, 50: 3351-3358, 2007.

NOOR IDORA, M. S.; FERRY, M.; WAN NIK, W.B.; JASNIZAT, S. Evaluation of tannin from *Rhizophora apiculata* as natural antifouling agents in epoxy paint for marine application. **Progress in Organic Coatings**, 81: 125-131, 2015.

NORMAM-23/DPC - **Normas da Autoridade Marítima para o Controle de Sistemas Antiincrustantes Danosos em Embarcações**. Marinha do Brasil – Diretoria de Portos e Costas, 2007.

OLIVEIRA, G.P.; ECHEVENGUÁ, M.M; MESSIAS, R.S; **Processo de extração e caracterização do óleo de semente de uva**, UFRSC, Santa Catarina, 2003.

OLIVEIRA, M. C.; ESPERANÇA, P.; ALMOSTER FERREIRA, M. A. Characterization of anthocyanins by electrospray ionization and collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 15: 1525-1532, 2001.

OMAE, I. **Chemistry and Fate of Organotin Antifouling Biocides in the Environment**. In: Konstantinou, I. K. (eds.), *The Handbook of Environmental Chemistry*. Germany. pp. 17-50, 2006.

OMAE, I. Organotin antifouling paints and their alternatives. **Applied Organometallic Chemistry**, 17: 81-105, 2003.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, 49: 4619-4626, 2001.

PACE-ASCIK, C. R.; HAHN, S.; DIAMANDIS, E. P.; SOLEAS, G.; GOLDBERG, D. M. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. **Clinica Chimica Acta**, 235: 207–219, 1995.

PAIXÃO, N.; PEREIRA, V.; MARQUES, J. C.; CÂMARA, J. S. Quantification of polyphenols with potential antioxidant properties in wines using reverse phase HPLC. **Journal of Separation Science**, 31: 2189-2198, 2008.

PEREIRA, C.; JÚNIOR, B.; BOMFIM, C.; KUSTER, R. M.; SIMAS, N. K.; SAKURAGUI, C. M.; PORZEL, A.; WESSJOHANN, L. Flavonoids and a neolignan glucoside from *Guarea macrophylla* (Meliaceae). **Química Nova**, 35: 1123-1126, 2012.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, 39: 791-800, 2006.

PÉREZ, M.; BLUSTEIN, G.; GARCÍA, M.; DEL AMO, B.; STUPAK, M. Cupric tannate: a low copper content antifouling pigment. **Progress in Organic Coatings**, 55: 311-315, 2006.

PINELO, M.; RUBILAR, M.; JEREZ, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, M. J. (2005). Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53: 2111-2117, 2005.

PING, L.; PIZZI, A.; GUO, Z. D.; BROSSE, N. Condensed tannins from grape pomace: characterization by FTIR and MALDI TOF and production of environment friendly wood adhesive. **Industrial Crops and Products**, 40: 13-20, 2012.

PISSARRA, J.; LOURENÇO, S.; GONZÁLEZ-PARAMÁS, A.M.; MATEUS, N.; SANTOS-BUELGA, C.; DE FREITAS, V. Formation of new anthocyanin-alkyl/aryl-flavanol pigments in model solutions. **Analytica Chimica Acta**, 513: 215–221, 2004.

PRIEUR, C.; RIGAUD, J.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. **Phytochemistry**, 36: 781-784, 1994.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A.; MELLO, L. M. R. de. Vitivinicultura brasileira: regiões tradicionais e pólos emergentes. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, 27: 7-15, 2006.

QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSEGU, L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, 50: 586-621, 2011.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KIRKHAM, P. A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochemical Pharmacology** 72: 1439-1452, 2006.

RENAUD, S.; DE LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **The Lancet**, 339: 1523–1526, 1992.

RENTZSCH, M.; SCHWARZ, M.; WINTERHALTER, P. Pyranoanthocyanins-An overview on structures, occurrence, and pathways of formation. **Trends in Food Science & Technology**, 18: 526–534, 2007.

REYNERTSON, K. A.; WALLACE, A. M.; ADACHI, S.; GIL, R. R.; YANG, H.; BASILE, M. J.; D'ARMIENTO, J.; WEINSTEIN, I. B.; KENNELLY, E. J. Bioactive Depsides and Anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria c auliflora*). **Journal of Natural Products**, 6: 1228-1230, 2006.

RIBEIRO, T. P. **Caracterização de subprodutos do processamento de uvas produzidas no Vale do São Francisco**. Tese Doutorado- UFERSA. 183 p. 2005.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÉCHE, B.; LONVAUD, A. **Handbook of Enology: the microbiology of wine and vinifications**. 2ed. Wiley & Sons, 2006. 429 p.

RIZZON, L.A.; SGANZERLA, V.M.A. Ácidos tartárico e málico no mosto de uva em Bento Gonçalves-RS. *Ciência Rural*, Santa Maria, 37: 911-914, 2007.

ROCKENBACH, I. I.; GONZAGA, L. V.; RIZELIO, V. M. S. S.; GONÇALVES, A. E.; GENOVESE, M. I. 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 Research International**, 44: 897-901, 2011a.

ROCKENBACH, I. I.; JUNGFER, E.; RITTER, C.; SANTIAGO-SCHÜBEL, B.; THIELE, B.; FETT, R.; GALENSA, R. Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MS n and LC-ESI-FTICR-MS. **Food Research International**, 48: 848-855, 2012.

ROCKENBACH, I. I.; RODRIGUES, E.; GONZAGA, L. V.; CALIARI, V.; GENOVESE, M. I.; GONÇALVES, A. E. S. S.; FETT, R. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. **Food Chemistry**, 127:174–179, 2011b.

ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 28: 238-244, 2008.

RODRIGO, R.; MIRANDA, A.; VERGARA, L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. **Clinica Chimica Acta**, 412: 410-424, 2011.

ROSA, E. A. D.; SILVA, B. C.; SILVA, F. M. D.; TANAKA, C.; PERALTA, R. M.; OLIVEIRA, C.; KATO, L.; FERREIRA, H.D.; SILVA, C. C. D. Flavonoids and antioxidant activity in *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 20: 484-488, 2010.

SANTOS, J. I. **Vinhos: o essencial**. 4 ed. São Paulo: SENAC, 2004.

SAPHIER A. D.; HOFFMANN T. C. Forecasting models to quantify three anthropogenic stresses on coral reefs from marine recreation: Anchor damage, diver contact and copper emission from antifouling paint. **Marine Pollution Bulletin**, 51: 590-598, 2005.

SÁYAGO-AYERDI, S. G.; BRENES, A.; GOÑI, I. Effect of grape antioxidant dietary fiber on the lipid oxidation of raw and cooked chicken hamburgers. **LWT-Food Science and Technology**, 42: 971-976, 2009.

SBAGHI, M.; JEANDET, P.; BESSIS, R.; LEROUX, P. Degradation of stilbene-type phytoalexins in relation to the pathogenicity of *Botrytis cinerea* to grapevines. **Plant Pathology**, 45: 139–144, 1996.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, 91: 21-40, 2001.

SCHWARZ, M.; WABNITZ, T.C.; WINTERHALTER, P. Pathway leading to the formation of anthocyaninvinylphenol adducts and related pigments in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51: 3682–3687, 2003.

SHRIKHANDE, A. J. Wine by-products with health benefits. **Food Research International**, 33: 469–474, 2000.

SILKINA, A.; BAZES, A.; VOUVÉ, F.; LE TILLY, V.; DOUZENEL, P.; MOUGUET, J. L.; BOURGOUGNON, N. Antifouling activity of macroalgal extracts on *Fragilaria pinnata* (Bacillariophyceae): A comparison with Diuron. **Aquatic Toxicology**, 94: 245-254, 2009.

SILVA, D. B.; LOPES, N. P. MALDI-MS of flavonoids: a systematic investigation of ionization and in-source dissociation mechanisms. **Journal of Mass Spectrometry**, 50: 182–190, 2015.

SILVA, L. M. L. R. Caracterização dos subprodutos da vinificação. **Millenium**, 28: 123-133, 2003.

SILVA, R.; LOPES, N. P.; SILVA, D. B. Application of MALDI Mass Spectrometry in Natural Products Analysis. **Planta medica**, 82: 671-689, 2016.

SILVA, T.; CAMARA, C. A.; LINS, A.; AGRA, M. D. F.; SILVA, E.; REIS, I. T.; FREITAS, B. M. Chemical composition, botanical evaluation and screening of radical scavenging activity of collected pollen by the stingless bees *Melipona rufiventris* (Uruçu-amarela). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 81: 173-178, 2009.

SINGH, A.; HOLVOET, S.; MERCENIER, A. Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases. **Clinical and Experimental Allergy**, 41: 1346-1359, 2011.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, 299: 152-178, 1999.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. **American Journal Enology and Viticulture**, 28: 49-55, 1977.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 3^a ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, 2012, 768p.

SOVAK, M. Grape extract, resveratrol, and its analogs: a review. **Journal of Medicinal Food**, 4: 93-105, 2001.

SRINAVASAN M.; SWAIN G. W. Managing the use of copper-based antifouling paints. **Environmental Management**, 39: 423-441, 2007.

SUN, B.; LEANDRO, C.; DA SILVA, J. R.; SPRANGER, I. Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerisation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46: 1390-1396, 1998.

SUN, B.; LEANDRO, M.C.; DE FREITAS, V.; SPRANGER, M.I. Fractionation of red wine polyphenols by solid-phase extraction and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1128: 27–38, 2006.

TALA, V. R. S.; CANDIDA DA SILVA, V.; RODRIGUES, C. M.; NKENGFACK, A. E.; CAMPANER DOS SANTOS, L.; VILEGAS, W. Characterization of Proanthocyanidins from *Parkia biglobosa* (Jacq.) G. Don. (Fabaceae) by Flow Injection Analysis—Electrospray Ionization Ion Trap Tandem Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Molecules**, 18: 2803-2820, 2013.

TANAKA, K.; WAKI, H.; IDO, Y.; AKITA, S.; YOSHIDA, Y.; YOSHIDA, T.; MATSUO, T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry**, 2: 151-153, 1988.

TENG, B.; JIAN, X.; WANG, Y.; CHEN, W. Characterization of Acacia mangium Tannin Fractions Extracted with Different Organic Solvents. **Asian Journal of Chemistry**, 27: 1847-1850, 2015.

TOALDO, I. M.; GOIS, J. S.; FOGOLARI, O.; HAMANN, D.; BORGES, D. L. G.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Phytochemical polyphenol extraction and elemental composition of *Vitis labrusca* L. grape juices through optimization of pectinolytic activity. **Food and Bioprocess Technology**, 7: 2581–2594, 2004.

TORRES, J.L.; BOBET, R. New flavanol derivatives from grape (*Vitis vinifera*) byproducts: antioxidant aminoethylthio-flavan-3-ol conjugates from a polymeric waste fraction used as a source of flavanols, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48: 4627–4634, 2001.

TOUNSI, S. M. Valorization of three varieties of grape. **Industrial Crops and Products**, 30: 292–296, 2009.

TURNER, A. Marine pollution from antifouling paint particles. **Marine Pollution Bulletin**, 60: 159-171, 2010.

VAN HUYNH, A.; BEVINGTON, J. M. MALDI-TOF MS analysis of proanthocyanidins in two lowland tropical forest species of Cecropia: a first look at their chemical structures. **Molecules**, 19: 14484-14495, 2014.

VEIGA, L. F.; VITAL, N. **Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia sp.*** In: I. A. Nascimento, E. C. P. M., Sousa & M. Nipper (ed.), Métodos em ecotoxicologia marinha. Aplicações no Brasil. Artes Gráficas e Indústria, São Paulo, p.111-122, 2002.

VELICKOVSKA, S. K.; MIRHOSSEINI, H.; BOGEVA, E. Isolation of Anthocyanins by High-Speed Countercurrent Chromatography and Application of the Color Activity Concept to Different Varieties of Red Grape Pomace from Macedonia. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, 3: 243-247, 2013.

VERGARA, C.; MARDONES, C.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; VON BAER, D. Comparison of high-performance liquid chromatography separation of red wine anthocyanins on a mixed-mode ion-exchange reversed-phase and on a reversed-phase column. **Journal of Chromatography A**, 1217: 5710–5717, 2010.

VERMERRIS, W. & NICHOLSON, R. **Phenolic compound biochemistry**, Springer, The Netherlands, 2006.

VERSARI, A. BOULTON, R. B. PARPINELLO, G. P. A comparison of analytical methods for measuring the color components of red wines. **Food Chemistry**, 106: 397–402, 2008.

VIDAL, S.; FRANCIS, L.; GUYOT, S.; MARNET, N.; KWIATKOWSKI, M.; GAWEL, R.; CHEYNIER, V.; WATERS, E. J. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 83: 564–573, 2003.

VIDAL, S.; FRANCIS, L.; NOBLE, A.; KWIATKOWSKI, M.; CHEYNIER, V.; WATERS, E. Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. **Analytica Chimica Acta**, 513: 57–65, 2004.

VIVAR-QUINTANA, A. M.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C. Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. **Analytica Chimica Acta**, 458: 147-155, 2002.

VIVAS, N.; NONIER, M. F.; DE GAULEJAC, N. V.; ABSALON, C.; BERTRAND, A.; MIRABEL, M. Differentiation of proanthocyanidin tannins from seeds, skins and stems of grapes (*Vitis vinifera*) and heartwood of Quebracho (*Schinopsis balansae*) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and thioacidolysis/liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 513: 247-256, 2004.

WANG, J.; KALT, W.; SPORNS, P. Comparison between HPLC and MALDI-TOF MS analysis of anthocyanins in highbush Blueberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48: 3330–3335, 2000.

WANG, D. M.; PU, W. J.; WANG, Y. H.; ZHANG, Y. J.; WANG, S. S. A new isorhamnetin glycoside and other phenolic compounds from *Callianthemum taipaicum*. **Molecules**, 17: 4595-4603, 2012.

WANG, H.; RACE, E. J.; SHRIKHANDE, A. J. Characterization of anthocyanins in grape juices by ion trap liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51: 1839–1844, 2003.

WANG, S.; HUANG, K. Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, 1032: 273-279, 2004.

WOISKY, R. G; SALATINO, A. Analysis os propolis: some parameters ond prodecore for chemical fuality control. **Journal of Apicultural Research**, 37: 99-105, 1998.

WU, X., & PRIOR, R. L. (2005). Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the United States: vegetables, nuts, and grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53: 3101-3113, 2005b.

WU, X.; PRIOR, R. L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53: 2589-2599, 2005a.

XU, C.; ZHANG, Y.; CAO, L.; LU, J. Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. **Food Chemistry**, 119: 1557 – 1565, 2010.

YANG, J.; MARTINSON, T. E.; LIU, R. H. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. **Food Chemistry**, 116: 332-339, 2009.

YANG, Y.; CHIEN, M. Characterization of grape procyanidins using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48: 3990-3996, 2000.

YEBRA, D.M.; KIIL, S.; DAM-JOHANSEN, K. Antifouling technology – past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. **Progress in Organic Coatings**, 50: 75 – 104, 2004.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin and gallic acid. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 52: 255-260, 2004.

YU, J.; AHMEDNA, M.; GOKTEPE, I. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. **Food Chemistry**, 90: 199-206, 2005.

ZANUS, M. C. **Panorama da vitivinicultura brasileira**. Embrapa Uva e Vinho, XV Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia. Bento Gonçalves-RS, Novembro de 2015.

ZHANG, L. L.; LIN, Y. M. HPLC, NMR and MALDI-TOF MS analysis of condensed tannins from *Lithocarpus glaber* leaves with potent free radical scavenging activity. **Molecules**, 13: 2986-3029, 2008.

8. ANEXO

TRABALHOS REALIZADOS NO PERÍODO DO DOUTORADO

Artigos completos publicados em periódicos

1. SILVA, TANIA MARIA SARMENTO; DE SOUZA, SILVANA ALVES; DIAS, THAYS LIMA MATOS FREIRE; **SILVA, TELMA MARIA GUEDES**; FALCÃO, ROSANGELA ALVES; MOREIRA, MAGNA SUZANA ALEXANDRE; SILVA, EVA MONICA SARMENTO; CAMARA, CELSO AMORIM. Chemical composition, antinociceptive and free radicalscavenging activities of geopropolis from *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Sociobiology*. , v.61, p.560 565, 2015.
2. CLEMENTINO-NETO, JOSÉ; PEREIRA, JOEDNA; VASCONCELOS, LUIZ; DE SOUZA, IARA; SILVA, ANNE; **SILVA, TELMA**; RAMOS, NATALIA; PESSÔA, HILZETH; SILVA, TANIA; DA SILVA, BAGNÓLIA; DE CAVALCANTE, FABIANA. Toxicological, Antidiarrheal and Spasmolytic Activities of *Solanum paniculatum*. *Planta Medica*. , v.82, p.58 64, 2015.
3. DE MORAES PEIXOTO, RODOLFO; DE MORAES PEIXOTO ARAÚJO, RENATA; E SILVA PEIXOTO, LUCIANA JATOBÁ; GONÇALVES BOMFIM, SILVIO ALAN; **GUEDES DA SILVA, TELMA MARIA**; SARMENTO SILVA, TANIA MARIA; GUEDES DA SILVA ALMEIDA, JACKSON ROBERTO; MOTA, RINALDO APARECIDO; DA COSTA, MATEUS MATIUZZI. Treatment of goat mastitis experimentally induced by *Staphylococcus aureus* using a formulation containing *Hymenaea martiana* extract. *Small Ruminant Research*. , v.130, p.229 235, 2015.
4. **SILVA, TELMA MARIA G. DA**; SILVA, PAULO RICARDO DA; CAMARA, CELSO A.; SILVA, GERLANIA S. DA; SANTOS, FRANCISCO DE ASSIS R. DOS; SILVA, TANIA MARIA S. Chemical Analysis and Antioxidant Potential of

- Angico Honey Collected by Stingless Bee *Jandaíra*. Revista Virtual de Química. , v.6, p.1370 1379, 2014.
5. MORAES, M. M.; SILVA, R. R.; **SILVA, T. M. G.**; CAMARA, C. A. G.; RAMOS, C. S. Cicardian variation of essential oil from *Piper marginatum* Jacq.. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. , v.13, p.270 277, 2014.
 6. FERREIRA, RAFAELA O.; JUNIOR, ALMIR R. DE CARVALHO; **DA SILVA, TELMA M.G.**; CASTRO, ROSANE N.; DA SILVA, TANIA M.S.; DE CARVALHO, MÁRIO G. Distribution of metabolites in galled and nongalled leaves of *Clusia lanceolata* and its antioxidant activity. Revista Brasileira de Farmacognosia (Impresso). , v.24, p.617 625, 2014.
 7. FALCAO, R. A.; NASCIMENTO, P. L. A.; SOUZA, S. A.; **SILVA, T. M. G.**; QUEIROZ, A. C.; MATTA, C. B. B.; MOREIRA, M. S. A.; CAMARA, C. A.; TANIA M. S. DA SILVA. Antileishmanial Phenylpropanoids from the Leaves of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. Evidence Based Complementary and Alternative Medicine (Print). , v.2013, p.1 7, 2013.

Patente

SILVA, T. M. G.; AQUINO, K. A. S.; SILVA, T. M. S.; ARAUJO, P. L. B.; ARAUJO, E. S. Tinta antiincrustante contendo resíduos da indústria vinícola e sua produção, 2015. Categoria: Produto e Processo. Instituição onde foi depositada: INPI Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR10201502818. Data de depósito: 09/11/2015. Depositante/Titular: TELMA MARIA GUEDES DA SILVA, KATIA APARECIDA DA SILVA AQUINO, TANIA MARIA SARMENTO DA SILVA, PATRÍCIA LOPES BARROS DE ARAÚJO, ELMO SILVANO DE ARAÚJO.

Apresentação de trabalhos em congressos

1. ALMEIDA, N. B.; SANTOS, P. A. N. A.; SILVA, M. M. N.; SILVA da, G. R.; **SILVA, T. M. G.**; SOUZA, S. A.; ALVES, R. F.; SANTOS, F. A. R.; SILVA, T. M. S. Análise de açúcares do pólen apícola de *elaeis guineensis* In: X SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FARMACOGNOSIA, 2015, PETROLINA-PE.
2. SANTOS, P. A. N. A.; SILVA, M. M. N.; ALMEIDA, N. B.; SILVA da, G. R.; **SILVA, T. M. G.**; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S.; ALVES, R. F.; SANTOS, F. A. R. Análise físicoquímica e potencial antioxidante do pólen apícola de dendê In: X SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FARMACOGNOSIA, 2015, PETROLINA-PE.
3. SILVA, M. M. N.; SANTOS, P. A. N. A.; ALMEIDA, N. B.; SILVA da, G. R.; **SILVA, T. M. G.**; SILVA, T. M. S.; ALVES, R. F.; SANTOS, F. A. R. Análises físicoquímica, açúcares e potencial antioxidante do pólen apícola de *Rhynchosphora* (Cyperaceae) In: X SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FARMACOGNOSIA, 2015, PETROLINA-PE.
4. FERREIRA, R. O.; CARVALHO JR., A. R.; **SILVA, T. M. G.**; SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G. Perfil químico de extratos foliares de *Clusia lanceolata* por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LCMS/MS) In: 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014, NATAL/RN.
5. PEIXOTO, R. M.; ARAÚJO, R. M. P.; PEIXOTO, L. J. S.; REIS, S. A. G. B.; **SILVA, T. M. G.**; SILVA, T. M. S.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MOTA, R. A.; COSTA, M. M. Tratamento da mastite caprina induzida experimentalmente por *Staphylococcus aureus* utilizando um protocolo contendo extrato natural In: 41º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2014, GRAMADO/RS.
6. **SILVA, T. M. G.**; CAMARA, C. A.; AGRA, M. F.; SILVA, T. M. S. 3 AMINOSPIROSTANE ALKALOIDS FROM SOLANUM PANICULATUM

(JURUBEBA VERDADEIRA) ROOTS In: IV CONGRESO IBEROAMERICANO DE PRODUCTS NATURALES EN PATAGONIA, 2014, RÍO GALLEGOS.

7. CONCEICAO, D. C. O.; **SILVA, T. M. G.**; NATIVIDADE, T. B.; OLIVEIRA, G. P.; CAMARA, C. A.; SILVA, T.M. S. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos das folhas de *Bauhinia cheilantha* e *Bauhinia pentandra* In: 54° Congresso Brasileiro de Química, 2014, NATAL/RN.
8. NATIVIDADE, T. B.; SILVA da, G. R.; CONCEICAO, D. C. O.; OLIVEIRA, G. P.; **SILVA, T. M. G.**; SILVA, E. M. S.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S. Avaliação do teor de fenólicos totais e atividade antioxidante do pólen meliponícola da Jandaíra (*Melipona subnitida* DUCKE) In: 54° Congresso Brasileiro de Química, 2014, NATAL/RN.
9. OLIVEIRA, G. P.; **SILVA, T. M. G.**; CONCEICAO, D. C. O.; NATIVIDADE, T. B.; CAMARA, C. A.; SANTANA, A. L. B. D.; SILVA, T. M. S. Chalcona isolada da resina de *Amburana cearensis* (Fabaceae) In: 54° Congresso Brasileiro de Química, 2014, NATAL/RN.
10. **SILVA, T. M. G.**; RAMOS, N. S. M.; RIBEIRO, A. M. A; SILVA, I. A. A.; TENÓRIO, J. A. B. ; SILVA, P. R.; SILVA, E. M. S.; SILVA, T. M. S. Análise Físico Química e Potencial Antioxidante do Mel de Angico Produzido pelas Abelhas Sem Ferrão Jandaira e In: IV Simpósio de Plantas Mediciniais do Vale do São Francisco, 2013, PETROLINA.
11. SOUZA, S. A.; **SILVA, T. M. G.**; SILVA, E. M. S.; CAMARA, C. A.; TANIA M. S. DA SILVA. Análise sazonal dos fenólicos e potencial antioxidante de amostras de geoprópolis coletadas pela abelha sem ferrão jandaíra (*Melipona subnitida* DUCKE) In: IV Simpósio de Plantas Mediciniais do Vale do São Francisco, 2013, PETROLINA.

12. OLIVEIRA, G. P.; **SILVA, T. M. G.**; NATIVIDADE, T. B.; CAMARA, C. A.; SANTANA, A. L. B. D.; SILVA, T. M. S. Atividade Sequestradora de Radical Livre da Resina de *Amburana cearensis* (Fabaceae) In: IV Simpósio de Plantas Medicinais do Vale do São Francisco, 2013, PETROLINA.
13. **SILVA, T. M. G.**; MORAES, M. M.; SILVA, R. R.; RAMOS, C. S.; CAMARA, C. A. G. Cicardian Variation of Essential Oil from *Piper marginatum* Jacq In: 4th Brazilian Conference on Natural Products and XXX Anual Meeting on Micromolecular Evolution, Sytematics and Ecology, 2013, NATAL/RN.
14. SILVA F. C.; **SILVA, T. M. G.**; OLIVEIRA, D. C.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S. Potencial Antioxidante dos Resíduos de Uva da Região do Vale de São Francisco In: IV Simpósio de Plantas Medicinais do Vale do São Francisco, 2013, PETROLINA.
15. **SILVA, T. M. G.**; RAMOS, N. S. M.; Ribeiro, A. M. A; Silva, I. A. A.; Tenório, J. A. B. ; Silva, P. R.; Silva, E. M. S.; SILVA, T. M. S. Isolamento e Quantificação do Alcaloide 4 quinolona e dos ácidos (2E, 4E) abscísico e (2Z, 4E) abscísico nos Méis de Jandaira (*Melipona subnitida* Ducke) In: 53° Congresso Brasileiro de Química, 2013, RIO DE JANEIRO.
16. **SILVA, T. M. G.**; RAMOS, N. S. M.; CAMARA, C. A.; RAMOS, C. S.; SILVA, T. M. S. Novos Alcaloides da Raízes de *Solanum paniculatum* (Solanaceae) In: 53° Congresso Brasileiro de Química, 2013, RIO DE JANEIRO.
17. SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; SILVA, E. M. S.; **SILVA, T. M. G.**; PINTO, F. C. T. análise do potencial antioxidante da geoprópolis da mandaçaia (*Melipona mandacaia*) In: 35ª Reunião anual da sociedade brasileira de química, 2012, ÁGUAS DE LINDÓIA.

- 18.RAMOS, N. S. M.; **SILVA, T. M. G.**; SILVA, T. M. S. Efeito no estado de amadurecimento na atividade antioxidante dos frutos de *Solanum stramonifolium* In: 22º Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2012, BENTO GONÇALVES/RS.
- 19.SOUSA, J. C. F.; SILVA, T. M. S.; BARBOSA FILHO, J. M.; BATTACHARYYA, J.; **SILVA, T. M. G.**; SANTOS, B. V. O.; LIRA, D. P. Estudo fitiquimico de *piptadenia stipulacea* In: 22º Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2012, BENTO GONÇALVES/RS.



DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 2/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: KÁTIA APARECIDA DA SILVA AQUINO

6.2 Qualificação: DOUTORA

6.3 CPF: 781.669.264-15

6.4 Endereço Completo: RUA PAVUNA, 20, BLOCO E, APTO. 301, CURADO - RECIFE - PE

6.5 CEP: 50.940-370

6.6 Telefone: (81) 8884-6174

6.7 FAX: (81) 2126-8959

6.8 E-mail: aquino@ufpe.br

continua em folha anexa

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial.

Artigo 12 da LPI – período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:

Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

9. Procurador (74):

9.1 Nome: XXX

9.2 CNPJ/CPF: XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 9.3 API/OAB: XXXXXXXXXXXXXXXXX

9.4 Endereço Completo: XXX

9.5 CEP: XXXXXXXXXXXXXXXXX

9.6 Telefone: XXXXXXXXXXXXXXXXX

9.7 FAX: XXXXXXXXXXXXXXXXX

9.8 E-mail: XXX

continua em folha anexa

10. Listagem de sequências biológicas.

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 3/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

11. Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas);
(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

	Documentos Anexados		folhas
X	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	01
	11.2	Procuração.	
	11.3	Documentos de Prioridade.	
	11.4	Documento de contrato de trabalho.	
X	11.5	Relatório descritivo.	10
X	11.6	Reivindicações.	02
X	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: nº, _____ por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	01
X	11.8	Resumo.	01
	11.9	Listagem de sequências em arquivo eletrônico: _____ nº de CDs ou DVDs (original e cópia).	
	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de sequências.	
	11.11	Listagem de sequências em formato impresso.	
	11.12	Declaração relativa à Listagem de sequências.	
X	11.13	Outros (especificar) ANEXO 01 (COINVENTORES); DELEGAÇÃO DE PODERES	02

12. Total de folhas anexadas: 17 fls.

13. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Recife, 06 de novembro de 2015.

Local e Data

Assinatura e Carimbo
Solange Galvão Coutinho
Diretora de Inovação - UFPE
SIAPE: 1132321

ANEXO 1

INVENTORES: Continuação do quadro 6. Inventor(72) do Formulário Código FQ001.

(2) Nome: Telma Maria Guedes da Silva

Qualificação: Doutoranda

RG: 6.828.640

Orgão/UF: SDS-PE

CPF: 061.249.534-55

Endereço: Avenida Araçá, 807, apto. 102

Bairro/Cidade/UF: Aldeia dos Camarás – Camaragibe - PE.

CEP: 54.750-000

Telefone: (81) 98846-5332

(3) Nome: Tânia Maria Sarmento da Silva

Qualificação: PhD

RG: 1.447.299

Orgão/UF: SSP

CPF: 951.205.054-49

Endereço: Estrada do Encanamento, 608

Bairro/Cidade/UF: Casa Forte – Recife - PE.

CEP: 52.070-000

Telefone: (81) 98799-8221

(4) Nome: Patrícia Lopes Barros de Araújo

Qualificação: Doutor

RG: 4.662.631

Orgão/UF: SSP-PE

CPF: 526.644.304-91

Endereço: Rua Gregório Bezerra, s/n, Cond. Ricaflora. Lote 1

Bairro/Cidade/UF: Aldeia – Camaragibe - PE.

CEP: 54.789-835

Telefone: (81) 99164-8812 / 99958-8599 / 3459-1049 Ramal 201

(5) Nome: Elmo Silvano de Araújo

Qualificação: Doutor

RG: 788.613

Orgão/UF: SSP

CPF: 276.087.514-87

Endereço: Rua Gregório Bezerra, s/n, Cond. Ricaflora. Lote 1

Bairro/Cidade/UF: Aldeia – Camaragibe - PE.

CEP: 54.789-835

Telefone: (81) 9248-3090 / 2126-7987

TINTA ANTI-INCRUSTANTE CONTENDO RESÍDUOS DA INDÚSTRIA VINÍCOLA E PROCESSO DE PRODUÇÃO

[001] O presente relatório revela componentes anti-incrustantes obtidos do resíduo de uva (*Vitis* sp.) como material básico, para o desenvolvimento de tinta à base de água ou de solventes orgânicos. A tinta aditivada com estes componentes poderá ser utilizada em cascos de embarcações, tanques, redes, metais e outros com o objetivo de evitar a adesão e proliferação de organismos como cracas, mexilhões, caramujos, crustáceos em geral e outros nas suas respectivas paredes. Trata-se de produto de alto consumo, ambientalmente amigável e eficiente.

[002] O produto e processo de produção apresentados se referem a componentes para tinta anti-incrustante aplicada em estruturas submersas, obtidos de resíduo agroindustrial da indústria vinícola, principalmente, mas não restrito a uvas das variedades Itália e Shiraz, ricos em compostos orgânicos fenólicos.

[003] Na literatura brasileira de patentes não foram encontrados registro de componente ativo para tintas anti-incrustantes similar ao aqui apresentado, utilizando resíduo industrial. A patente BR 102012001393 relata um agente anti-incrustante compreendendo taninos (do tipo condensado e hidrolisável), tanato de cobre (TC) ou tanato de ferro obtidos a partir de taninos de Acácia, Pinheiro, Castanheira, Tara e outros, porém não há porcentagem nem a caracterização dos taninos retirados das espécies vegetais utilizados na tinta. Por outro lado, na literatura internacional de patentes não foram encontrados registros com este teor.

[004] Tintas e revestimentos são produtos comerciais de largo uso em todo o mundo e movimentam mais de 5 bilhões de dólares ao ano só nos EUA. A grande variedade de formulações disponível no mercado atende às mais diversas necessidades de aplicações e custos. Entretanto, durante esta primeira década do séc. XXI, exigências ambientais têm começado a impor novos padrões para as formulações de tintas e revestimentos, tanto no Brasil quanto no resto do mundo. Novas legislações propostas em diversos países seguem a tendência de limitar ou banir o uso de substâncias que vêm sendo utilizadas há anos ou mesmo séculos, para a proteção de superfícies.

[005] Dentre os diversos grupos de contaminantes orgânicos potencialmente danosos a ecossistemas aquáticos, despontaram nos últimos anos os biocidas utilizados como princípio ativo de tintas anti-incrustantes. Essas tintas são aplicadas como sistemas de proteção, com a finalidade de combater a formação e o estabelecimento de comunidades bioincrustantes (fouling) sobre superfícies expostas à água. Usualmente, tintas anti-incrustantes são aplicadas em embarcações comerciais e de passeio, plataformas petrolíferas, tubulações submarinas, comportas de represas, tanques destinados à aquicultura, dentre outras estruturas.

[006] Em virtude da constante pressão internacional sobre a utilização de tintas anti-incrustantes, a indústria naval tem frequentemente buscado alternativas ambientalmente amigáveis. Entre essas iniciativas destacam-se o desenvolvimento de tintas anti-incrustantes à base de produtos naturais e os revestimentos livres de biocidas.

[007] Na busca de alternativas menos poluentes, vários tipos de

compostos naturais vêm sendo testados em formulações anti-incrustantes, dentre estes compostos estão os taninos. Os taninos (proantocianidinas) são oligômeros de flavan-3-ol com uma média de polimerização variando de 2 a >15 unidades e com massa molecular variando de 578 a >5000 Da (Labarbe, B., Cheynier, V., Brossaud, F., Souquet, J. M., Moutounet, M. Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 47, 2719- 2723, 1999; Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., Moutounet, M. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, 36, 781-784, 1994; Sun, B., Leandro, C., Ricardo da Silva, J., Spranger, I. Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerisation. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1390-1396, 1998). A ação anti-incrustante de taninos é conhecida desde os anos de 1950 (Knowles, E. & White, T. The Protection of Metals with Tannins, *Journal of the Oil and Color Chemists Association*, 41, 10, 1958) e há relatos de estudos com substâncias pertencentes a esta classe de produtos naturais, extraídas de plantas de diferentes espécies (Noor Idora, M. S., Ferry, M., Wan, W.B., Nik, Jasnizat, S. Evaluation of tannin from *Rhizophora apiculata* as natural antifouling agents in epoxy paint for marine application, *Progress in Organic Coatings*, 81, 125-131, 2015) . Tintas anti-incrustantes à base de taninos podem ser uma alternativa eficaz e ambientalmente amigável às tintas anti-incrustantes comerciais. Um dos inconvenientes dos taninos é a solubilidade em água, que acelera a lixiviação deste aditivo da superfície pintada para o meio. Uma solução interessante é a reação de taninos com pequenas proporções de íons Cu^{2+} que resulta em

complexos de tanato de cobre de baixa solubilidade em água e associam as atividades anti-incrustantes do tanino e do cobre em um único aditivo, que pode ser incorporado a tintas da mesma forma que outros aditivos insolúveis comuns, como os pigmentos (Andrade, J. M., Ferreira, C. A., Prevedello, A. L. A., Oliveira, L. S. Síntese e Caracterização de Pigmento Antifouling não Convencional a Base de Tanino. 19º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, Campos do Jordão, SP, Brasil, 2010).

[008] O grande problema da utilização de taninos é o acesso à fonte natural de onde eles podem ser extraídos. Alguns utilizam taninos extraídos de cascas de árvores adultas, o que exige dano, em certa extensão, ao vegetal.

[009] A presente proposta sugere a utilização de extratos do bagaço da uva (resíduo) oriundo do processo da fabricação do vinho em vinícolas da Região do Vale do São Francisco, que são ricos em fenólicos e não estão ainda inseridos em nenhuma cadeia produtiva de aproveitamento de resíduos, até onde temos conhecimento. O produto, descrito neste relatório, revela uma preparação de tinta à base de extratos ambientalmente amigáveis de resíduos da indústria vinícola.

[0010] O Vale de São Francisco engloba cidades entre Pernambuco e Bahia. A região caminha para ser um dos importantes produtores vitivinícolas do país. Responsável por 99% da uva de mesa exportada pelo Brasil e pela produção de 6 milhões de litros de vinhos finos por ano. A viticultura pernambucana/baiana já detém 15% do mercado nacional e emprega diretamente 30 mil pessoas naquela região, única do mundo a produzir duas safras e meia por ano. Os compostos fenólicos estão presentes em maior

quantidade principalmente nas sementes da uva. No processo de vinificação estes compostos são extraídos da uva e o álcool produzido na fermentação ajuda neste processo. O conteúdo de fenólicos que resta no bagaço e o teor inicial que contém a uva do Vale de São Francisco são interesses deste estudo. O bagaço é um subproduto da vinificação que geralmente é desprezado na natureza. Apesar de se tratar de um resíduo biodegradável, o acúmulo deste produto pode se tornar um sério problema ambiental, já que precisa de um tempo mínimo para ser mineralizado. A invenção objetiva caracterizar quimicamente os resíduos provenientes da indústria vinícola especificamente da região do Vale do São Francisco e utilizar estes resíduos na indústria como aditivos de tintas anti-incrustantes possibilitando a população desta região, conhecer melhor seus produtos e oferecer uma oportunidade de agregar valor a sua indústria vinícola com ampliação do seu mercado de trabalho.

[0011] Os compostos obtidos a partir dos resíduos são de baixo custo, eficazes e ambientalmente amigáveis.

[0012] O aditivo, objeto reivindicado neste relatório, tem aplicação direta na indústria de tintas. Já a tinta, produzida pelo método descrito neste relatório, tem aplicação direta na indústria naval para proteção de cascos contra proliferação de micro-organismos. Além disso, as vinícolas podem agregar valor comercial ao resíduo de uva produzido com um impacto na economia local e geração de novos empregos.

[0013] A Figura 1 representa evidências da ação da tinta no controle da proliferação de cracas: a) Branco (placa pintada com tinta sem aditivo antiincrustante); b) Placa pintada com Tinta contendo complexo de resíduo de

uva com cobre; c) Placa pintada com tinta contendo complexo obtido de tanino comercial (Controle positivo).

[0014] A tinta anti-incrustante compreende: pigmento anti-incrustante derivado cúprico do resíduo da uva e cobre, entre 1 e 20 %, em volume, carbonato de cálcio, entre 1 e 15% em volume, resina de pinheiro (colofônio) entre 5 e 20%, estearato de alumínio, 25 sobre a massa total, solvente (xileno/benzina 4:1) 50% em volume. Os sólidos foram triturados em moinho de bolas de porcelana por 24h e peneirados em tamiz mesh 50. O solvente foi acrescentado à mistura de sólidos e a suspensão foi mantida em agitação por 48h, em temperatura ambiente. Corpos de prova foram preparados para realização do teste de imersão no litoral do Rio Grande do Norte, em Extremoz. O experimento foi realizado em tanques na unidade experimental do setor de pesca da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. O local foi escolhido por ser rico em nutrientes e por apresentar proliferação rápida de cracas. As placas de acrílico e de (8cm×16cm) foram previamente lixadas, lavadas com detergente e álcool e secas ao ar. Em seguida a formulação com o complexo de cobre foi aplicada sobre as superfícies das placas, obtendo-se camadas uniformes. A tinta apresentou boa homogeneidade. O experimento foi realizado em três tempos diferentes utilizando concentrações diferentes do complexo de cobre com o resíduo. Como controle positivo foi utilizado o tanato de cobre, já conhecido por apresentar atividade antifouling (Noor Idora, M. S., Ferry, M., Wan, W.B., Nik, Jasnizat, S. Evaluation of tannin from *Rhizophora apiculata* as natural antifouling agents in epoxy paint for marine application, *Progress in Organic Coatings*, 81, 125-131, 2015). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e as

placas foram colocadas em profundidades de 0,5 e 1,0 m de profundidade. Na Figura 1 do Anexo A é possível observar a diferença entre as placas pintadas com a base da tinta sem o aditivo anti- incrustante (branco) e as placas pintadas com a formulação anti-incrustante. É interessante notar que a atividade anticraca do complexo resíduo-cobre foi melhor que o tanato de cobre utilizado como controle positivo. Este resultado mostra a eficácia da tinta desenvolvida e revelada neste relatório. A parte experimental para obtenção dos extratos e derivados (aditivos) foi realizada no Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

[0015] O procedimento experimental representativo otimizado para o processo em questão: os extratos ricos em fenólicos foram obtidos do resíduo da uva (compreendendo de gainha, cascas e sementes). A extração foi realizada com misturas de acetona:água (variando entre proporções de 7:3 até 1:1) ou etanol:água (variando entre proporções de 8:2 a 1:1). Em especial, foram utilizados os extratos mais ricos em fenólicos, preferencialmente os das variedades Itália e Shiraz (*Vitis sp.*), constituindo de 10-42% de fenólicos. Destes fenólicos, para os resíduos das uvas Itália e Shiraz 0,3-0,6% pertencem a classe dos flavonóides, 3-13 % são taninos hidrolisáveis e 3-20 % são taninos condensados e para o resíduo da uva Shiraz 20% é composto ainda de antocianinas monoméricas. Para a análise dos fenólicos foi utilizado o método de Folin-Ciacauteau (Slinkard, K., & Singleton, V. L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods, *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55, 1977) e para os flavonóides e taninos foi de acordo com Vermerris, W. & Nicholson, R. *Phenolic compound biochemistry*, Springer,

The Netherlands, 2006. Mais precisamente para análise dos componentes foi utilizada a extração em SPE (extração em fase sólida) e cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV com arranjo de diodo (CLAE-DAD).

[0016] Na preparação dos derivados foi utilizada a seguinte metodologia: Para a síntese dos compostos de cobre, foram utilizados 20-40 g dos extratos dos bagaços da uvas em 200-400 mL de água quente a aproximadamente 60°C. Esta solução, simultaneamente, com 40-80 mL de uma solução de sulfato cúprico 1,0 M, foram adicionadas a um Becker, contendo uma solução de Hidróxido de sódio (NaOH) 0,04 M, previamente aquecido até 60°C. A mistura então permaneceu sob temperatura de 60°C e agitação constante, até a precipitação do derivado metálico (Perez, M., Blustein, G., Garcia, M., Del Amo, B., Stupak, M. Cupric tannate: a low copper content antifouling pigment. Progress in Organic Coatings, 55:311-331, 2006). Após a precipitação, o pH foi ajustado até aproximadamente 5,5 com solução de hidróxido de potássio (KOH) 40% filtrado e o precipitado formado foi recolhido, lavado com água destilada e seco. Como controle positivo, foram preparados derivados de cobre do ácido tânico P.A. (MERCK), seguindo o procedimento acima descrito. A presença do derivado com cobre foi observada pela análise dos espectros de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR, obtido com pastilha KBr). Para o espectro dos extratos dos resíduos foram observados as bandas de absorção em torno de 1723 cm^{-1} (C=O) e em 2379 cm^{-1} (OH) para grupos carboxilas dos derivados de ácidos carboxílicos, como também as bandas de absorção para carboxilas conjugadas dos possíveis flavonoides em 1611 cm^{-1} . Esta última banda de C=O permaneceu nos derivados com cobre. As novas bandas de absorção foram

verificadas em 1442 e 1524 cm^{-1} (estiramento simétrico e assimétrico para COO^- , respectivamente), estas últimas bandas reforçam a interação entre os íons cobre e os grupos carboxilatos presente no resíduo. A quantidade do cobre complexado nos extratos compreende de 34 a 39 %. A quantidade de cobre foi analisada por absorção atômica.

[0017] Lista de referências bibliográficas

[0018] Andrade, J. M., Ferreira, C. A., Prevedello, A. L. A., Oliveira, L. S. Síntese e Caracterização de Pigmento Antifouling não Convencional a Base de Tanino. 19º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, Campos do Jordão, SP, Brasil, 2010.

[0019] Knowles, E., White, T. The Protection of Metals with Tannins, *Journal of the Oil and Color Chemists Association*, 41, 10-23, 1958.

[0020] Labarbe, B., Cheynier, V., Brossaud, F., Souquet, J. M., Moutounet, M. Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 47, 2719-2723, 1999.

[0021] Noor Idora, M. S., Ferry, M., Wan, W.B., Nik, Jasnizat, S. Evaluation of tannin from *Rhizophora apiculata* as natural antifouling agents in epoxy paint for marine application. *Progress in Organic Coatings*, 81, 125-131, 2015.

[0022] Perez, M., Blustein, G., Garcia, M., Del Amo, B., Stupak, M. Cupric tannate: a low copper content antifouling pigment. *Progress in Organic Coatings*, 55:311-331, 2006.

[0023] Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., Moutounet, M. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, 36, 781-784, 1994.

[0024] Slinkard, K., Singleton, V. L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods, *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55, 1977.

[0025] Sun, B., Leandro, C., Ricardo da Silva, J., Spranger, I. Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerisation. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1390-1396, 1998.

[0026] Vermerris, W., Nicholson, R. *Phenolic compound biochemistry*, Springer, The Netherlands, 2006.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE TINTA ANTI-INCRUSTANTE CONTENDO RESÍDUOS DA INDÚSTRIA VINÍCOLA caracterizado por compreender as seguintes etapas:

a) extração de substâncias fenólicas de fontes vegetais por misturas de acetona:água (variando entre proporções de 7:3 até 1:1) ou etanol:água (variando entre proporções de 8:2 a 1:1),

b) síntese de compostos de cobre por 20-40 g dos extratos dos bagaços das uvas em 200-400 mL de água a 60°C, simultaneamente, com 40 a 80 mL de uma solução de sulfato cúprico 1,0 M, é adicionado em um recipiente, contendo uma solução de Hidróxido de sódio (NaOH) 0,04 M, previamente aquecido até 60°C sendo mistura mantida sob temperatura de 60°C e agitação constante, até a precipitação do derivado metálico,

c) ajuste do pH até 5,5 com solução de hidróxido de potássio (KOH) 40% filtrado e o precipitado formado é recolhido, lavado com água destilada e seco,

d) triturar os sólidos em moinho de bolas por 24h e peneirados em tamiz mesh 50,

e) acrescentar o solvente à mistura de sólidos da etapa d) e a suspensão é mantida em agitação por 48h, em temperatura ambiente.

2. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE TINTA ANTI-INCRUSTANTE CONTENDO RESÍDUOS DA INDÚSTRIA VINÍCOLA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelas substâncias fenólicas de fontes vegetais serem obtidos do resíduo da uva, compreendendo gainha, cascas e sementes.

3. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE TINTA ANTI-INCRUSTANTE CONTENDO RESÍDUOS DA INDÚSTRIA VINÍCOLA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelos extratos dos bagaços das uvas serem extraídos, preferencialmente de uvas das variedades Itália e Shiraz (*Vitis* sp.).

4. TINTA ANTI-INCRUSTANTE CONTENDO RESÍDUOS DA INDÚSTRIA VINÍCOLA produzida pelo processo da reivindicação 1, caracterizada por compreender: pigmento anti-incrustante, derivado cúprico, entre 1 e 20 %, em volume, carbonato de cálcio, entre 1 e 15% em volume, resina de pinheiro (colofônio) entre 5 e 20%, estearato de alumínio, 25 sobre a massa total, solvente (xileno/benzina 4:1) 50% em volume.

5. TINTA ANTI-INCRUSTANTE CONTENDO RESÍDUOS DA INDÚSTRIA VINÍCOLA de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo derivado cúprico ser do resíduo de uva com cobre.

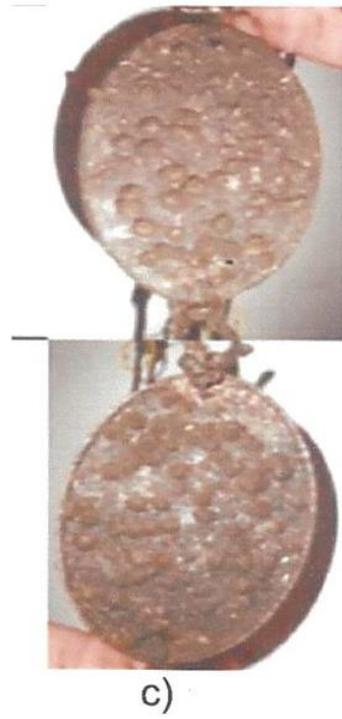
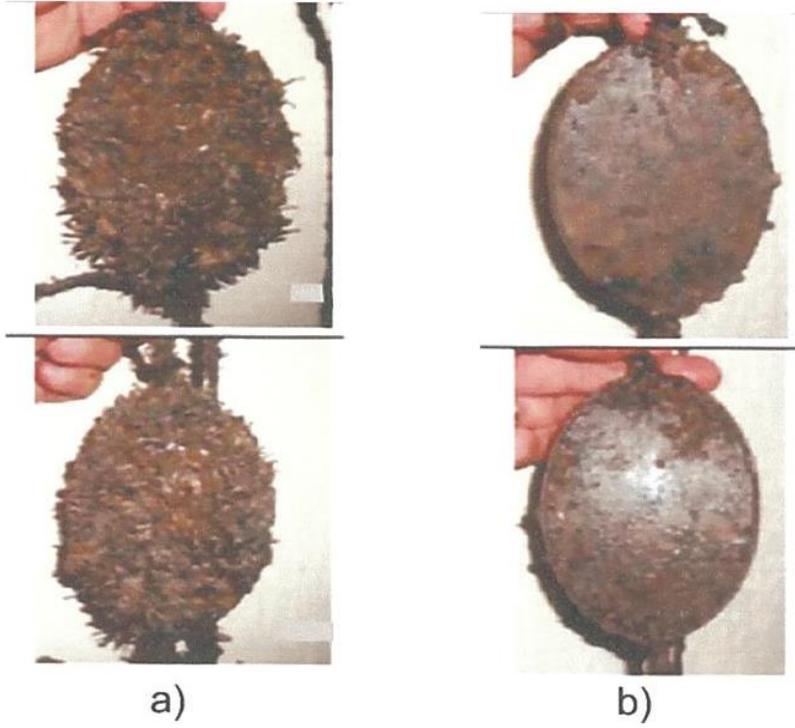


Fig. 1

RESUMO

TINTA ANTI-INCRUSTANTE CONTENDO RESÍDUOS DA INDÚSTRIA VINÍCOLA E PROCESSO DE PRODUÇÃO

Referem-se a processo de produção e tinta anti-incrustante aplicada em estruturas submersas, obtida de resíduo agroindustrial da indústria vinícola, principalmente, mas não restrito à uvas das variedades Itália e Shiraz, ricos em compostos orgânicos fenólicos, e sua composição compreende pigmento, derivado cúprico, entre 1 e 20 %, em volume, carbonato de cálcio, entre 1 e 15% em volume, resina de pinheiro (colofônio) entre 5 e 20%, estearato de alumínio, 25 sobre a massa total, solvente (xileno/benzina 4:1) 50% em volume.