

**PROSPECÇÃO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA EM RESÍDUOS DA
VITICULTURA NA PERSPECTIVA DA DESINFECÇÃO E ANTISSEPSIA
APLICADAS À SAÚDE E À PRODUÇÃO ANIMAL, BEM COMO À
AGROINDÚSTRIA FAMILIAR**

TESE DE DOUTORADO

RAQUEL TERESINHA CZAMANSKI

PORTO ALEGRE – RS

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**PROSPECÇÃO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA EM RESÍDUOS DA
VITICULTURA NA PERSPECTIVA DA DESINFECÇÃO E ANTISSEPSIA
APLICADAS À SAÚDE E À PRODUÇÃO ANIMAL, BEM COMO À
AGROINDÚSTRIA FAMILIAR**

Raquel Teresinha Czamanski

**Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor em
Ciências Veterinárias na especialidade
Medicina Veterinária Preventiva.**

Orientador: Prof. Dr. José Maria Wiest

**Porto Alegre - RS
2013**

CIP - Catalogação na Publicação

Czamanski, Raquel Teresinha

Prospecção de atividade antibacteriana em resíduos da viticultura na perspectiva da desinfecção e antissepsia aplicadas à saúde e à produção animal, bem como à agroindústria familiar / Raquel Teresinha Czamanski. -- 2013.

191 f.

Orientador: José Maria Wiest.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Resíduos da vinificação. 2. engaço. 3. atividade antibacteriana. 4. compostos fenólicos. 5. antocianinas. I. Wiest, José Maria, orient. II. Título.

RAQUEL TERESINHA CZAMANSKI

**PROSPECÇÃO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA EM RESÍDUOS DA
VITICULTURA NA PERSPECTIVA DA DESINFECÇÃO E ANTISSEPSIA
APLICADAS À SAÚDE E À PRODUÇÃO ANIMAL, BEM COMO À
AGROINDÚSTRIA FAMILIAR**

Aprovada em 09 de AGO 2013

APROVADA POR

Prof. Dr. JOSÉ MARIA WIEST
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. CÉSAR AUGUSTO MARCHIONATTI AVANCINI
Membro da Comissão

Profª. Drª. INGRID BERGMAN INCHAUSTI DE BARROS
Membro da Comissão

Dr. GEORGE WELLINGTON BASTOS DE MELO
Membro da Comissão

À minha família: Paulo, Daniel e Lucas

AGRADECIMENTOS

A Deus pela experiência de vida.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. José Maria Wiest pela amizade e oportunidade de crescimento profissional.

Aos Membros da Comissão de Avaliação: Dr. César Augusto Marchionatti Avancini, Dr^a. Ingrid Bergman Inchausti de Barros e Dr. George Wellington Basttos de Melo, pela disponibilidade e contribuições na avaliação da tese.

A Dr^a. Isa Beatriz Noll, Dr. César Augusto Marchionatti Avancini e Dr. George Wellington Basttos de Melo pelas valiosas contribuições durante a qualificação.

A minha amiga, técnica administrativa, Dr^a. Heloisa Helena Chaves Carvalho pelo apoio técnico e metodológico.

Aos meus amigos doutorandos e mestrados, sob orientação do Prof. Dr. Wiest, pela amizade e convívio durante estes quatro anos.

Agradecimento especial à amiga Aline Campos Vieira pela valiosa ajuda nas análises.

Agradecimento especial aos amigos Giovani Girolometto e Carin Gerhardt pela organização do laboratório de Higiene e pela disposição em ajudar sempre.

Agradecimento especial ao amigo Antônio Elísio José pelo carinho e trocas culturais.

Às bolsistas Mirela Schein e Jossielen Pontes pela dedicação e preparo dos materiais.

À bolsista Sâmela Pereira da Silva pela leitura das placas bacteriológicas.

À vinícola Mena Kaho pela gentileza em fornecer a maioria dos resíduos da viticultura em cultivo orgânico.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

À prof^a. Jandyra Maria Guimarães Fachel e ao técnico administrativo Gilberto Pereira Mesquita do Núcleo de Assessoria Estatística do Instituto de Matemática pelo apoio estatístico na fase de conclusão da pesquisa.

Ao Instituto Federal do Rio Grande do Sul *Campus* Bento Gonçalves.

“A SABEDORIA DA NATUREZA É TAL QUE NÃO PRODUZ NADA DE
SUPÉRFLUO OU INÚTIL.”
NICOLAU COPÉRNICO

TÍTULO: Prospecção de atividade antibacteriana em resíduos da viticultura na perspectiva da desinfecção e antissepsia aplicadas à saúde e à produção animal, bem como à agroindústria familiar

Autora: Raquel Teresinha Czamanski

Orientador: Prof. Dr. José Maria Wiest

RESUMO

A viticultura é uma atividade de grande importância econômica para o país, destacando-se a sustentabilidade da pequena propriedade e o desenvolvimento territorial associado às atividades ligadas ao turismo. Nos últimos anos, esta atividade tem gerado emprego em grandes empreendimentos que produzem uvas de mesa e uvas para processamento. A quantidade de resíduos gerados por esta atividade, se não forem devidamente tratados, podem causar severas consequências ao meio ambiente, poluindo o solo e contaminando as fontes de água. Considerando a importância da busca de alternativas à destinação de resíduos da viticultura, com ênfase aos paradigmas de cultivo orgânico, determinou-se a atividade antibacteriana em diferentes extratos de engajo, casca e folha na perspectiva de sua aplicação como produtos desinfetantes ou antissépticos em situações-problema específicos em saúde e em produção animal, bem como em situações de agregação de valor a matéria-prima desta origem, em sistema de agroindústria familiar ou de pequeno porte. Através de Testes de Diluição em Sistema de Tubos Múltiplos obteve-se a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima, a intensidade de atividade de inibição bacteriana (IINIB/Bacteriostasia) e a intensidade de atividade de inativação bacteriana (IINAB/Bactericidia) de extratos etanólicos e hidroetanólicos de engajo, casca e folha de videiras de três cultivares diferentes ('Bordô', 'Isabel' e 'Moscato'). As amostras foram coletadas em fevereiro e março de 2011, no município de Bento Gonçalves/RS. Os inóculos bacterianos padronizados de interesse veterinário utilizados foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 11229), e *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076). Paralelamente a atividade antibacteriana, o teor de polifenóis totais e de antocianinas dos extratos dos diferentes resíduos foram quantificados. Também foram realizados testes de decocto com os resíduos dos três cultivares selecionados, porém este método de extração dos princípios ativos não apresentou nenhuma atividade antibacteriana. A atividade antibacteriana dos extratos com melhor resultado foi obtido pela extração etanólica, superior aos extratos hidroetanólicos. Houve diferença significativa entre os cultivares analisados e quanto aos tipos de resíduos; sendo o extrato etanólico de engajo do cultivar 'Bordô' que apresentou melhor resultado. As bactérias Gram-negativas foram mais sensíveis aos extratos etanólicos e hidroetanólicos, enquanto que a bactéria mais resistente foi *Staphylococcus aureus*, independente dos resíduos utilizados. Em relação ao teor de compostos fenólicos, o extrato etanólico do cultivar 'Bordô' foi significativamente superior, sugerindo uma relação direta entre a concentração de polifenóis totais e a atividade antibacteriana encontrada. As antocianinas foram encontradas somente nos extratos etanólicos e hidroetanólicos de cascas; exceto para o cultivar 'Moscato'. Resíduos da viticultura, em especial o engajo, mostrou grande potencial a ser utilizado como fonte de fenóis para produtos desinfetantes a serem utilizados na produção animal e/ou agroindústria familiar.

Palavras - chave: Resíduos da viticultura, engajo, atividade antibacteriana, compostos fenólicos, antocianinas.

TITLE: *Prospecting for activity antibacterial of residues in the viticulture from the perspective of disinfection and antiseptics applied to health and livestock production, as well as the family agroindustry*

ABSTRACT

*Viticulture is an activity of great economic importance for the country, highlighting the sustainability of small property and territorial development linked to tourism-related activities. In recent years, this activity has generated employment in large enterprises that produce table grapes and grapes for processing. The amount of residues generated by this activity, if not properly treated, can cause severe consequences to the environment, polluting the soil and contaminating water sources. Considering the importance of the search for alternatives to waste disposal of viticulture, with emphasis on the paradigms of organic farming, it was determined the antibacterial activity in different extracts of stalks, bark and leaf in view of its application as disinfectants or antiseptics in problem situations specific health and animal production as well as in situations of adding value to the raw material of this origin system in agro family or small business. Through Test Dilution System Multiple Tubes obtained the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration, the intensity of bacterial inhibition activity (IINIB/Bacteriostasia) and intensity of bacterial inactivation (IINAB/ Bactericidia) ethanolics extracts and hydroethanolics of stalks, bark and leaf vines three different cultivars ('Bordô', 'Isabel' and 'Moscato'). Tests were made of decoction with residues of the three selected cultivars, but this method of extraction of active principles showed no antibacterial activity. The samples were collected in February and March 2011, in the city of Bento Gonçalves/RS. The bacterial inocula standardized veterinary interest selected were used: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 11229) and *Salmonella Enteritidis* (ATCC 13076). Alongside the antibacterial activity, the content of total polyphenols and anthocyanins extracts of different residues were quantified. The antibacterial activity of the extracts with best result was obtained by ethanolic extraction, higher than the hydroethanolic extraction. There were significant differences among cultivars analyzed and the type of residue, and the ethanolic extract of grape stalk of the cultivar 'Bordô' which shows better result. Gram-negative bacteria are more sensitive to the ethanolic and hydroethanolic extracts, while the bacteria more resistant *Staphylococcus aureus* was independent of the residues materials. Regarding the content of phenolic compounds, the ethanolic extract of the cultivar 'Bordô' was significantly higher, suggesting a direct relationship between the concentration of phenolic compounds and antibacterial activity found. Anthocyanins were only found in ethanolics extracts and hydroethanolics barks, except for the cultivar 'Moscato'. Residues of viticulture, especially stalks, showed great potential to be used as a source of phenols for disinfectant products for use in animal production and/or agroindustry family.*

Key - words: *residues of viticulture, grape stalk, antibacterial activity, phenolic compounds, anthocyanins.*

SUMÁRIO

	Pág.
CAPÍTULO I	
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Considerações Iniciais	16
1.2 Exposição do problema de pesquisa	17
1.3 Hipóteses	18
1.4 Objetivo geral	18
1.5 Objetivos específicos	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Viticultura	20
2.2 Aspectos botânicos da videira	25
2.3 Uva	27
2.3.1 Melhoramento genético	29
2.4 Efeitos benéficos	30
2.5 Composição química	33
2.5.1 Compostos fenólicos	35
2.5.2 Antocianinas	37
2.5.3 Taninos	39
2.6 Uva Isabel	40
2.6.1 Uva Isabel Precoce	41
2.7 Uva Bordô	42
2.8 Uva Moscato	43
2.9 Uva Niágara Rosada	44
2.10 Resíduos da agricultura	44
2.11 Resíduos da vinificação	47
2.12 Antibacterianos naturais	52
2.13 Atividade antibacteriana em subprodutos da uva	53
2.14 As bases da viticultura orgânica	55
2.15 Regulamentação – viticultura orgânica	56
2.16 Agricultor como sujeito em agroecologia	58
2.17 As zoonoses	60
2.18 Desinfetantes e antissépticos	62
CAPÍTULO II	
3 MATERIAIS E MÉTODOS	63
3.1 Amostras	63
3.2 Seleção e preparo das amostras	63
3.3 Seleção e preparo dos inóculos	64
3.4 Método para obtenção dos extratos	65
3.5 Método para obtenção do decocto	66
3.6 Método de avaliação da atividade antibacteriana	67
3.7 Teste de suspensão	70
3.7.1 Teste de suspensão simples	71
3.7.2 Teste simulando condições práticas de uso	72
3.7.2.1 Teste de suspensão com suporte	72
3.7.2.2 Teste de suspensão com matéria orgânica	74
3.8 Polifenóis	74
3.8.1 Método de extração	74
3.8.2 Determinação dos polifenóis	74
3.9 Antocianinas	75
3.10 Análises estatísticas	77
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
4.1 Resultados	77
4.2 Discussão	81
5 CONCLUSÕES	85
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
APÊNDICES	108
Artigo 1	109
Artigo 2	126
ANEXOS	168

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 – Gravura de Leonardo Posenato.....	21
Figura 2 – Engaço de uva – Inflorescência tipo cacho cônico.....	26
Figura 3 – Fotografia de Engaço de uva	167
Figura 4 – Fotografia de Bagaço de uva	167

LISTA DE QUADROS

Pág.

Quadro 1 - Amplitude da composição (mínimo e máximo) do mosto de uva fresca, sã e madura.....	169
Quadro 2 - Força Real dos Líquidos Espirituosos	171
Quadro 3 - Representação das variáveis IINIB (intensidade de atividade de inibição bacteriana) e IINAB (intensidade de atividade de inativação bacteriana), e suas correspondentes diluições e doses infectantes dos inóculos.....	70
Quadro 4 - Uvas processadas (milhões de kg) no estado do RS.....	172

LISTA DE TABELAS

Pág

Tabela 1 - Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB - ausência de desinibidores bacterianos) e Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB - presença de desinibidores bacterianos) de Extrato Etanólico dos resíduos de uva 'BORDÔ' e suas concentrações, em diferentes tempos de leitura, para Bactérias Gram-positivas..... 143

Tabela 2 - Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB - ausência de desinibidores bacterianos) e Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB - presença de desinibidores bacterianos) de Extrato Etanólico dos resíduos de uva 'BORDÔ' e suas concentrações, em diferentes tempos de leitura, para Bactérias Gram-negativas144

Tabela 3 - Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB - ausência de desinibidores bacterianos) e Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB - presença de desinibidores bacterianos) de Extrato Hidroetanólico dos resíduos de uva 'BORDÔ' e suas concentrações, em diferentes tempos de leitura, para Bactérias Gram-positivas145

Tabela 4 - Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB - ausência de desinibidores bacterianos) e Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB - presença de desinibidores bacterianos) de Extrato Hidroetanólico dos resíduos de uva 'BORDÔ' e suas concentrações, em diferentes tempos de leitura, para Bactérias Gram-negativas146

Tabela 5 - Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB - ausência de desinibidores bacterianos) e Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB - presença de desinibidores bacterianos) de Extrato Etanólico dos resíduos de uva 'ISABEL' e suas concentrações, em diferentes tempos de leitura, para Bactérias Gram-positivas147

Tabela 6 - Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB - ausência de desinibidores bacterianos) e Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB - presença de desinibidores bacterianos) de Extrato Etanólico dos resíduos de uva 'ISABEL' e suas concentrações, em diferentes tempos de leitura, para Bactérias Gram-negativas148

Tabela 7 - Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB - ausência de desinibidores bacterianos) e Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB - presença de desinibidores bacterianos) de Extrato Hidroetanólico dos resíduos de uva 'ISABEL' e suas concentrações, em diferentes tempos de leitura, para Bactérias Gram-positivas149

Tabela 8 - Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB - ausência de desinibidores bacterianos) e Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB – presença de desinibidores bacterianos) de Extrato Hidroetanólico dos resíduos de uva ‘ISABEL’ e suas concentrações, em diferentes tempos de leitura, para Bactérias Gram-negativas150

Tabela 9 - Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB - ausência de desinibidores bacterianos) e Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB – presença de desinibidores bacterianos) de Extrato Etanólico dos resíduos de uva ‘MOSCATO’ e suas concentrações, em diferentes tempos de leitura, para Bactérias Gram-positivas151

Tabela 10 - Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB - ausência de desinibidores bacterianos) e Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB – presença de desinibidores bacterianos) de Extrato Etanólico dos resíduos de uva ‘MOSCATO’ e suas concentrações, em diferentes tempos de leitura, para Bactérias Gram-negativas152

Tabela 11 - Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB - ausência de desinibidores bacterianos) e Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB – presença de desinibidores bacterianos) de Extrato Hidroetanólico dos resíduos de uva ‘MOSCATO’ e suas concentrações, em diferentes tempos de leitura, para Bactérias Gram-positivas153

Tabela 12 - Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB - ausência de desinibidores bacterianos) e Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB – presença de desinibidores bacterianos) de Extrato Hidroetanólico dos resíduos de uva ‘MOSCATO’ e suas concentrações, em diferentes tempos de leitura, para Bactérias Gram-negativas154

Tabela 13 - Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB - ausência de desinibidores bacterianos) e Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB – presença de desinibidores bacterianos) de Extrato Etanólico dos resíduos de uva ‘NIÁGARA ROSADA’ e suas concentrações, contra a Bactéria *Staphylococcus aureus*, em diferentes tempos de leitura.....155

Tabela 14 - Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB - ausência de desinibidores bacterianos) e Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB – presença de desinibidores bacterianos) de CALDA BORDALESA em duas concentrações, em diferentes tempos de leitura156

Tabela 15 - Polifenóis totais dos extratos de resíduos.....	157
Tabela 16 – Teste de suspensão simples	158
Tabela 17 - Teste de suspensão com suporte.....	159
Tabela 18 - Teste de suspensão com matéria orgânica leite integral.....	160
Tabela 19 - Teste de suspensão com matéria orgânica albumina sérica bovina.....	161

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Iniciais

A viticultura é uma atividade de grande importância econômica para o país, destacando-se a sustentabilidade da pequena propriedade e o desenvolvimento territorial associado às atividades ligadas ao turismo. Nos últimos anos, esta atividade tem gerado emprego em grandes empreendimentos que produzem uvas de mesa e uvas para processamento (MELLO, 2011).

Embora a produção de vinhos, suco de uva e derivados da uva e do vinho também ocorra em outras regiões, a maior concentração está no Rio Grande do Sul, onde são elaborados, em média anual, 330 milhões de litros de vinhos e mostos (sumo de uvas frescas que ainda não tenham passado pelo processo de fermentação) (MAPA, 2013).

De acordo com os dados estatísticos disponíveis no portal do IBGE, em 2011 houve aumento de 12,97% na produção de uvas no Brasil e o estado do Rio Grande do Sul apresentou aumento de 19,76% (MELLO, 2011). Entretanto, em 2012 houve redução de 0,52% na produção de uvas no Brasil, em relação ao ano de 2011, totalizando 1.455.056 toneladas (SOUZA, 2013).

No Rio Grande do Sul, a Serra Gaúcha é a principal região produtora, sendo a cidade de Bento Gonçalves conhecida como “a capital brasileira do vinho” (CIC BG, 2011). A viticultura na Serra Gaúcha estabeleceu-se a partir da colonização italiana, iniciada em 1875, como atividade tipicamente de agricultura familiar que envolve, atualmente, mais de onze mil propriedades vitícolas (PORTUGAL e PALACIOS, 2012).

Atualmente a viticultura vem se destacando também na região do Vale do Rio São Francisco. Os estados de Pernambuco e Bahia detém uma fatia do mercado nacional que gera diretamente milhares de empregos no Vale do São Francisco, única região do mundo que produz duas safras e meia por ano (MANICA e POOMER, 2006).

A quantidade de resíduos orgânicos gerados por esta atividade, incluindo bagaço, engaço, borra, entre outros, se não forem devidamente tratados, podem causar severas conseqüências ao meio ambiente, poluindo o solo e contaminando as fontes de

água. O acúmulo destes resíduos em local único pode acidificar o solo ocasionando baixo rendimento produtivo da lavoura. O engaço quando separado por máquina apropriada, (desengaçadeira) representa cerca de 3,5 a 4,5% da vindima em peso e 30% em volume (DA SILVA, 2003; MELO, 2010). Na safra de 2011 foram gerados aproximadamente, 28,4 milhões de kg de engaço, no estado do Rio Grande do Sul.

Diferentes plantas com indicativo etnográfico medicinal, condimentar ou aromático, submetidas a diferentes formas de extração, vem demonstrando atividade antibacteriana ao serem confrontados com agentes de zoonoses como *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Rodococcus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, inclusive em situações com alimentos de origem animal. O grupo de pesquisa dos alimentos de origem animal, pertencentes ao Diretório/CNPq, apresenta resultados de triagem promissores neste sentido, publicados segundo CARVALHO *et al.* (2005, 2006), SOUZA e WIEST (2007), AVANCINI *et al.* (2008a, b), WIEST *et al.* (2009a, b, c), MAJOLO (2009), PASSOS *et al.* (2010), MACIEL (2011).

Considerando a importância da busca de alternativas à destinação de resíduos da vitivinicultura, com ênfase aos paradigmas de cultivo orgânico, objetivou-se prospectar a atividade antibacteriana em diferentes extratos de folhas, engaço e casca na perspectiva de sua aplicação como produtos desinfetantes ou antissépticos em situações-problema específicos em saúde e em produção animal, bem como em situações de agregação de valor a matéria-prima desta origem, em sistema de agroindústria familiar ou de pequeno porte.

1.2 Exposição do problema de pesquisa

Qual a eficácia da atividade antibacteriana dos extratos de resíduos da vitivinicultura (engaço, casca) e folhas da videira frente às seguintes bactérias de interesse veterinário: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 11229) e *Salmonella Enteritidis* (ATCC 13076)?

1.3 Hipóteses

Espera-se que extratos de diferentes resíduos da viticultura (engajo, casca) e folhas de videira, apresentem atividade antibacteriana seletiva sobre bactérias de interesse veterinário, Gram-positivas e Gram-negativas; sendo possível determinar as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) e Concentrações Bactericidas Mínimas (CBMs), e que essa atividade possa ser expressa através da Intensidade de Atividade de Inibição (IINIB) ou da Intensidade de Atividade de Inativação (IINAB).

Espera-se encontrar diferenças significativas na intensidade de inibição/inativação bacteriana: dos extratos de diferentes resíduos da viticultura (casca, engajo) e folhas, obtidos pelos seguintes métodos de extração: etanólica, hidroetanólica e também, através de decocto.

Espera-se que exista diferença significativa nos teores totais de fenóis e de antocianinas das amostras analisadas (casca, engajo e folha), dos três diferentes cultivares selecionados ('Bordô', 'Isabel' e 'Moscato').

Espera-se que a atividade antibacteriana encontrada nos diferentes extratos apresentem correlação positiva com os compostos fenólicos totais e com as antocianinas quantificadas.

A atividade antibacteriana dos extratos de resíduos da viticultura (engajo, casca) e folhas da videira, espera-se ser seletiva quanto a presença/ausência de suporte (pano e madeira); ser seletiva quanto a matéria orgânica prevalente (leite integral e albumina sérica bovina), simulando sujidades em agroindústria familiar.

1.4 Objetivo geral

Prospectar a atividade antibacteriana dos resíduos da viticultura na perspectiva da desinfecção e antissepsia aplicadas à saúde e à produção animal, bem como à agroindústria familiar.

1.5 Objetivos específicos

Os objetivos específicos a serem alcançados ao término da pesquisa são: determinar *in vitro* as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) e Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana (IINIBs), Concentrações Bactericidas Mínimas (CBMs) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana (IINABs) de decocto e de extratos etanólicos e hidroetanólicos de resíduos (engajo, casca) e folhas de videiras em cultivo orgânico, provenientes de uvas tinta e branca, de três cultivares ('Bordô', 'Isabel', 'Moscato').

Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos frente a padrões internacionais ATCC (*American Type Culture Collection*): *Staphylococcus aureus* (ATCC 25.923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19.433), *Escherichia coli* (ATCC 11.229), *Salmonella Enteritidis* (ATCC 13.076), quanto ao tempo de exposição: (5', 15', 30' e 60'); presença ou ausência de suporte (pano, madeira); presença ou ausência de matéria orgânica (leite integral, albumina sérica bovina).

Determinar a correlação entre compostos fenólicos totais e antocianinas (3-D-glicosídeo cianidina) com a atividade antibacteriana encontrada nos extratos etanólicos e hidroetanólicos dos diferentes resíduos (engajo, casca) e folhas provenientes de videiras em cultivo orgânico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Viticultura

A viticultura é uma atividade economicamente importante no mundo globalizado. No Brasil destaca-se pela sustentabilidade de pequenas propriedades e, nos últimos anos, tem se tornado importante também na geração de emprego, em grandes empreendimentos para produção de uvas de mesa e uvas para processamento (EMBRAPA, 2009; MELLO, 2011).

A viticultura brasileira ocupa, atualmente, área de 81 mil hectares, com vinhedos desde o extremo Sul até regiões próximas à Linha do Equador (MAPA, 2013). A produção de uvas é da ordem de 1,2 milhões de toneladas/ano. Deste volume, cerca de 45% é destinado ao processamento, para a elaboração de vinhos, sucos e outros derivados, e 55% comercializado como uvas de mesa. Do total de produtos industrializados, 77% são vinhos de mesa e 10% são sucos de uva, ambos elaborados a partir de uvas de origem americana, especialmente cultivares de *Vitis labrusca*, *Vitis bourquina* e híbridos interespecíficos diversos. Cerca de 13% são vinhos finos, elaborados com castas de *Vitis vinifera*; o restante dos produtos industrializados, 1% do total, são outros derivados da uva e do vinho. Grande parte da produção brasileira de uvas e derivados da uva e do vinho são destinados ao mercado interno. O principal produto de exportação, em volume, é o suco de uva, sendo cerca de 15% do total destinado ao mercado externo; apenas 5% da produção de uvas de mesa é destinada à exportação e menos de 1% dos vinhos produzidos são comercializados fora do país (MELLO, 2011).

De acordo com Schroeder (1991), a história do vinho, como sucede a qualquer outro assunto suficientemente antigo e importante, tem as origens perdidas nas brumas da Pré-História e, conseqüentemente envolta em lendas, fabulações e mistérios. A uva precedeu o Homem e a evidência seria a descoberta de fósseis reproduzindo folhas de parreira. Não eram, evidentemente, folhas de *Vitis vinifera*, seriam antecessoras mais rudimentares da vinífera, responsável pelos grandes vinhos atuais. É válido denotar que a uva é uma das frutas de maior produção mundial, com mais de 67 milhões de toneladas ao ano, cultivada principalmente na variedade *Vitis vinifera* que é a mais utilizada para a produção de vinhos e para a produção de passas. (DE OLIVEIRA, 2010).

Há registros detalhados dos métodos egípcios de colheita, produção e transporte de vinho em pinturas como o da tumba de Nakht (1500 a.C.), na antiga Tebas. Muitas técnicas ilustradas ainda são usadas atualmente (VINHOS, 2008).



Fig. 01 Gravura de Leonardo Posenato – (Vinícola Salton)

Pintura da tumba de Nakht (1500 a.C.), na antiga Tebas

Historicamente, a viticultura brasileira começou ao redor de 1532 na Capitania de São Vicente, atual estado de São Paulo, estabelecendo-se alguns anos depois nos estados da Bahia e Pernambuco. Especula-se que o português Brás Cubas, considerado o primeiro vitivinicultor em terras brasileiras, tenha elaborado vinho por volta de 1535. No final do século XVII a viticultura surge nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso e Goiás; porém, com a expansão do cultivo da cana-de-açúcar e do café, praticamente desaparece. Por volta de 1830 a 1840, surgiram as variedades americanas, principalmente a ‘Isabel’, mais rústicas que as variedades de *Vitis vinifera* europeias, as quais juntamente com a chegada de imigrantes italianos, provocaram o ressurgimento da viticultura no estado de São Paulo, adquirindo significativa importância econômica na segunda metade do século XIX. No começo do século XX o cultivar ‘Isabel’ começou a ser substituído pelo cultivar ‘Niágara Branca’, proveniente dos EUA, sendo usada como uva de mesa, e pela ‘Seibel’, de origem francesa para vinificação. Em 1933, no município de Jundiaí, em consequência de mutação somática em uma planta de ‘Niágara Branca’, surgiu a variedade ‘Niágara Rosada’, que transformou toda a estrutura vitícola do estado de São Paulo, tornando-o o maior produtor de uva de mesa do Brasil da época (MIELE, 2003; POMMER, 2003).

O cultivo da videira no estado do Rio Grande do Sul provavelmente originou-se com as missões jesuítas, oriundas da Espanha, ao redor de 1626. Entretanto, alguns autores atribuem a plantação da viticultura neste estado aos imigrantes provenientes das Ilhas dos Açores, que colonizaram a região de Porto Alegre entre 1732 e 1773. Desta maneira os vinhedos do Rio Grande do Sul iniciaram-se com variedades de *Vitis vinifera*, de origem espanhola, seguidas depois pelas portuguesas, francesas, italianas. Com o aparecimento de cultivares americanos, representados principalmente por 'Isabel', esses estabeleceram absoluta dominância sobre os demais, situação que persiste atualmente. Novamente, a interação entre a imigração italiana e o cultivo das variedades americanas foi responsável pela fase acelerada da expansão da viticultura verificada a partir de 1870 a 1875, no estado do Rio Grande do Sul (POMMER, 2003).

A espécie mais cultivada no mundo é a *Vitis vinifera* também conhecida como uvas europeias ou uvas finas. A segunda espécie em importância pela área cultivada no mundo é a *Vitis labrusca*. O número de variedades cultivadas desta espécie limita-se a algumas dezenas. As uvas de *V. labrusca* são utilizadas para consumo *in natura* e para processamento, em especial para a elaboração de suco de uva; em alguns países da América e da Ásia também são elaborados vinhos com uvas labruscas. O cultivo de *Vitis bourquina* limita-se a poucos cultivares e está restrito a poucas zonas de cultivo. O número de variedades cultivadas de *Vitis rotundifolia* também é pequeno, e seu cultivo comercial tem importância apenas no Centro-Sul dos Estados Unidos. Os cultivares destas espécies, assim como cultivares híbridos interespecíficos, são todos classificados, no Brasil, como uvas comuns (CAMARGO, 2011).

A viticultura é uma atividade já tradicional em nove regiões brasileiras. Como zonas de viticultura temperada destacam-se as regiões da Fronteira, Serra do Sudeste, Serra Gaúcha, Campos de Cima da Serra e regiões Central e Norte do estado do Rio Grande do Sul; as regiões do Vale do Rio do Peixe, Planalto Serrano e Planalto Norte e Carbonífera, no estado de Santa Catarina; a região Sudeste do estado de São Paulo e, a região Sul do estado de Minas Gerais. A região Norte do Paraná é tipicamente subtropical e as regiões Noroeste do estado de São Paulo, Norte do estado de Minas Gerais e Vale do Submédio São Francisco (Pernambuco e Bahia), caracterizam-se como zonas tropicais, com sistemas de manejo adaptado às suas condições ambientais específicas. Além destes, novos pólos vitivinícolas estão surgindo em diferentes regiões do país, seja sob condições temperadas, tropicais ou subtropicais. A viticultura brasileira desenvolvida sob condições temperadas segue, em geral, os mesmos

procedimentos utilizados em países tradicionais no cultivo da videira. Já nas regiões de clima quente, adaptaram-se técnicas de manejo a cada situação específica, e os ciclos vegetativos e de produção são definidos em função das condições climáticas e das oportunidades e exigências do mercado (IBRAVIN 2011).

No estado do Rio Grande do Sul, foram registrados 38.505,23 hectares de parreiras, distribuídos em 15.384 propriedades. Neste contexto, a principal região produtora é a da Serra Gaúcha, cujas coordenadas geográficas e indicadores climáticos médios são: latitude 29°S, longitude 51°W, altitude 600-800 m, precipitação 1700 mm distribuídos ao longo do ano, temperatura 17,2°C e umidade relativa do ar 76%. (PROTAS e CAMARGO, 2010).

O Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho da Embrapa, cuja sede esta em Bento Gonçalves, utiliza o Cadastro Vitícola do Rio Grande do Sul, que é um sistema de gerenciamento de informações sobre os produtores, para registro das propriedades e produção de uvas na região (BLAUTH, 2007).

Trata-se de uma viticultura de pequenas propriedades, com média de 15 ha de área total, sendo destes 40% a 60% de área útil e 2,5 ha de vinhedos, pouco mecanizada devido à topografia acidentada, onde predomina o uso da mão-de-obra familiar, cada propriedade dispendo em média de 4 (quatro) pessoas. As condições ambientais determinam um período de repouso hibernar à videira. A poda é realizada em julho-agosto e a colheita está concentrada em janeiro e fevereiro. Cerca de 80% da produção é de uvas americanas (*V. labrusca*, *V. bourquina*) e híbridas, sendo 'Isabel' o cultivar de maior expressão (PROTAS *et al.*, 2008).

No Brasil, cerca de 10% da produção total de uvas é destinada à elaboração de suco. Devido à facilidade de elaboração, aliada às características organolépticas e ao seu valor nutricional, o suco de uva pode contribuir na dieta alimentar. Sob o aspecto nutricional, é comparado à própria uva por estarem presentes na sua composição, todos os constituintes principais, tais como: açúcares (glicose e frutose), minerais, ácidos, vitaminas e compostos fenólicos responsáveis pela cor e estrutura. A composição química do suco de uva difere do fruto quanto ao conteúdo de fibra bruta e óleo, componentes encontrados em maior quantidade nas sementes. A tecnologia de elaboração utilizada, especialmente no que se refere à temperatura e tempo de extração, regula a solubilidade e a intensidade de difusão das substâncias contidas na película

para o mosto, exercendo influência marcante na composição química e na tipicidade do produto final (RIZZON *et al.*, 1998).

O segmento de sucos vem mostrando clara tendência de crescimento nos últimos anos. Os principais cultivares utilizados são ‘Isabel’, ‘Concord’ e ‘Bordô’. Para a agroindústria e produtores de uvas para suco, o elevado teor glucométrico, a cor, o aroma e o sabor das uvas são características importantes, bem como o desenvolvimento de cultivares precoces e tardias que permitam a ampliação do período de colheita nas regiões produtoras (RITSCHER e CAMARGO, 2007).

Os sucos de uva, em 2011, continuaram com a trajetória crescente. O suco de uva integral apresentou aumento na quantidade comercializada de 28,60%, e o concentrado teve um acréscimo de 13,18%, em relação a 2010 (MELO, 2011).

A principal característica apresentada pelos cultivares para a elaboração de sucos é a preservação do sabor natural da uva após o processamento. A maioria dos cultivares *V. vinifera* se apresenta sem sabor após a pasteurização, entretanto os cultivares americanos e híbridos mantêm, no suco, o aroma e o sabor foxado, característico da uva *in natura* (LEÃO *et al.*, 2009).

Em 22 de outubro de 1959, a Lei federal nº 3646 criou o Colégio de Viticultura e Enologia de Bento Gonçalves, no estado do Rio Grande do Sul, que passou a funcionar de forma efetiva a partir de 27 de março de 1960. Em 25 de março de 1985, alterou sua denominação para Escola Agrotécnica Federal Presidente Juscelino Kubistchek. Em 2002 passou a ser Centro Federal de Educação Tecnológica e atualmente é um dos *Campus* do Instituto Federal do Rio Grande do Sul (IFRS-BG, 2013). Uma de suas finalidades é oferecer educação tecnológica com vistas à formação, qualificação, requalificação e reprofissionalização de jovens, adultos e trabalhadores em geral para os setores da economia, especialmente os da agropecuária, vitivinícola e agroindustrial (SOUZA, 2002a). Foi a primeira escola brasileira a formar enólogos, profissionais cujas atribuições são, entre outras, analisar as características físicas, químicas, botânicas, organolépticas e sanitárias da uva; executar as diferentes etapas e os procedimentos do cultivo da videira; manipular os equipamentos e materiais empregados nos procedimentos vitivinícolas; analisar os processos físicos, químicos, bioquímicos e microbiológicos inerentes à moderna tecnologia de vinificação; aplicar a legislação vigente das atividades e dos produtos vitivinícolas (BRASIL, 2007).

2.2 Aspectos botânicos da videira

A videira (*Vitis vinifera* L.) é a espécie frutífera de maior área cultivada no mundo e a mais importante em termos econômicos, totalizando 7,5 milhões de hectares (ha) cultivados em 177 países. As condições ambientais do trópico brasileiro, em suas diferentes regiões, possibilitam a planificação da produção de uvas ao longo do ano. Isso garante uvas de boa qualidade em períodos de desabastecimento no fornecimento internacional (abril-junho e novembro-dezembro) (DA SILVA, 2010).

As videiras se classificam em Cormófitas e Autotróficas; plantas com raiz, talo e folhas. Divisão Spermatophyta, planta com flor e semente; subdivisão Angiosperma (planta com semente dentro do fruto). Classe Dicotyledoneae, planta com dois cotilédones. Ordem Rhamnales, plantas lenhosas com um só ciclo de estames situados dentro das pétalas. Filo Terebintales-rubiales. Pertencentes à família Vitaceae ou Ampelidaceae, plantas com corola de pétalas soldadas na parte superior e de prefloração valvar, com cálice pouco desenvolvido, gineceu bicarpelar, bilocular, fruto tipo baga. Gênero *Vitis*, flores exclusivamente dióicas nas espécies silvestres e hermafroditas ou unissexuais nas cultivadas (DA SILVA, 2010; SOUZA e LORENZI, 2005).

A maioria dos cultivares de uva é altamente florífera e as inflorescências são formadas na maior parte dos nós ao longo do ramo. Dependendo do cultivar, cada broto latente contém mais de três inflorescências e cada inflorescência pode conter mil flores. Destas flores, 70 a 80% normalmente não evoluem para frutos maduros; elas secam e caem. O termo “Fruit Set” (DS0) é empregado para descrever a transformação de flores em frutos, isto é, o “estabelecimento dos frutos”. DS0 pode referir-se, também, à porcentagem de flores em uma inflorescência a qual se transforma em frutos (comumente de 20 a 30%) ou ao processo fisiológico envolvido nos estádios iniciais de desenvolvimento do fruto (MULLINS *et al.*, 1992).

Os frutos da videira apresentam três principais tipos de tecidos (casca, polpa e semente), que passam por mudanças físicas e bioquímicas bem definidas durante o desenvolvimento, particularmente durante o processo de amadurecimento (Conde *et al.*, 2007). Sendo um fruto do tipo não climatérico, isto é, sem a capacidade de amadurecer após a colheita (GIOVANNINI, 2001), o desenvolvimento de suas bagas pode ser dividido em três fases. Após a polinização e estabelecimento do fruto, inicia-se uma intensa fase de divisões celulares, crescimento do pericarpo e desenvolvimento lento do embrião, estendendo-se, em média, do 5º ao 30º dia após a antese. Esta etapa é seguida

por uma fase de diminuição das divisões celulares na qual o pericarpo cresce vagarosamente por expansão do tamanho celular e a semente entra no processo de maturação. Embora a atividade metabólica seja baixa nesta fase, o embrião desenvolve-se rapidamente (30° ao 45° dia após a antese). A extensão desta fase é que determina se o cultivar será de amadurecimento precoce ou tardio. A última etapa é caracterizada por amolecimento do pericarpo, expansão celular, aumento de diâmetro dos frutos e pela mudança de cor, processo conhecido entre os viticultores como *véraison* (OLLAT *et al.*, 2002; CONDE *et al.*, 2007). Esta última etapa continua, de acordo com o cultivar, por mais 35 a 65 dias (MULLINS *et al.*, 1992).

A identificação de cultivares de uva é tradicionalmente baseada na ampelografia, através da análise e comparação de características morfológicas de folhas, tipos de brotos, cachos e tipo de baga; no entanto, a perícia em ampelografia é restrita a um número pequeno e cada vez menor de especialistas. Além disso, a expressão das características morfológicas é influenciada por fatores ambientais, biológicos, histórico da planta; e plantas jovens são praticamente impossíveis de se identificar, porque com 4 (quatro) ou 5 (cinco) anos, ainda não exibem características morfológicas típicas de plantas adultas (REVERS e MACHADO, 2005).

A videira é composta basicamente por duas partes: a raiz que normalmente é subterrânea e o tronco que sustenta os ramos, folhas e frutos (WEAVER, 1976).

O engaço é composto por pedicelo primário (a), pedicelo secundário (b) e por hastes pincel (c), que dão sustentação aos grãos (d) de uva.

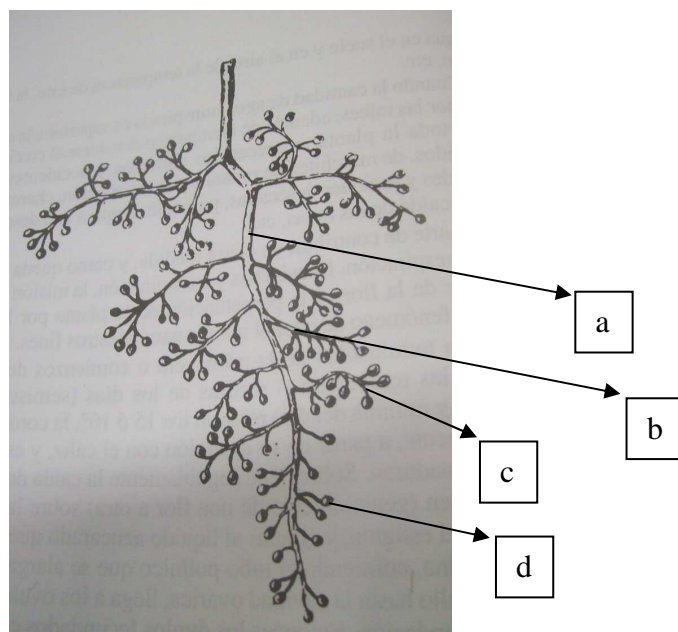


Fig. 02 Engaço de uva - Inflorescência tipo cacho cônico (Hidalgo, 2003)

2.3 Uva

A espécie *Vitis vinifera* L. surgida no Cáucaso (entre a Armênia e a Pérsia), difundiu-se por toda a Ásia Menor (Turquia, Iraque), Oriente Médio (Síria, Líbano, Israel e Jordânia) e costa do Mediterrâneo. Posteriormente foi levada à América e à Oceania. É a principal espécie para a elaboração de vinhos e seus derivados, para consumo *in natura* e para a produção de passas. Destaca-se pela qualidade de seus frutos e pela fineza dos seus vinhos. Seu cultivo é limitado, pois apresenta sensibilidade às moléstias fúngicas que elevam os custos de produção. Na região sul do Brasil, alguns cultivares apresentam sensibilidade às podridões da uva e à antracnose aumentando as dificuldades de seu cultivo. Pelas suas qualidades é amplamente utilizada em trabalhos de melhoramento genético (GIOVANNINI, 1999).

A videira é uma cultura que se adapta bem a vários tipos de solos, sendo que seu desempenho produtivo é melhor naqueles com boa capacidade de suprimento de nutrientes. No Brasil, a videira é cultivada em uma grande diversidade de solos, encontram-se cultivos em solos altamente intemperizados, bem como em solos jovens com alta capacidade de suprimento de nutrientes. No entanto, a grande maioria dos cultivos é feita em solos que apresentam alguma limitação nutricional, sendo fósforo e boro, respectivamente, macro e micronutriente mais limitantes, tornando-se necessário correções para que as plantas tenham condições de expressarem seu máximo potencial produtivo (MELO, 2008).

A uva da espécie *Vitis vinifera* L. tem grande importância na economia mundial, principalmente devido ao seu uso como matéria-prima para a fabricação de vinhos e outros derivados. Essa espécie foi cultivada por várias civilizações europeias durante milhares de anos, o que originou dezenas de variedades, as denominadas castas, através de seleção artificial (YANG *et al.*, 2009).

Até a década de 1960, quando teve início a difusão dos cultivares desenvolvidos pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), a viticultura brasileira dependia totalmente de cultivares importados. A partir desta época, alguns cultivares do IAC ganharam expressão, destacando-se IAC 116-31 'Rainha' e IAC 138-22 'Máximo' como uvas para vinho, IAC 871-41 'Patrícia' e IAC 842-4v 'Piratininga' como uvas de mesa, e os porta-enxertos IAC 313 'Tropical', IAC 572 'Jales' e IAC 766 'Campinas'. O processo de difusão dos cultivares do IAC se deu pelo fornecimento de pequenas quantidades de material propagativo aos produtores que, após algum tempo de

observação, multiplicavam e difundiam os novos cultivares, passando de viticultor a viticultor (EMBRAPA, 2008).

No Brasil, o cultivo da videira começou em 1535, trazida pelos portugueses à Capitania de São Vicente, atuais estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. A imigração italiana em São Paulo e no Rio Grande do Sul no final do século XIX deu um grande impulso à cultura (MELLO, 2002).

A produção de uvas no Brasil está localizada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste. Constitui-se em atividade consolidada, com importância socioeconômica, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, os quais respondem por 97% da produção nacional de vinhos. A uva ‘Isabel’ é um dos principais cultivares de *Vitis labrusca*, e a ‘Niágara Rosada’, resultado da mutação somática ocorrida na uva Niágara Branca (*Vitis labrusca* L. x *Vitis vinifera* L.). São destaques como uvas de mesa comuns, sendo variedades rústicas e, portanto, menos exigentes (SOARES *et al.*, 2008). A quantidade de uvas processadas pelas empresas do Rio Grande do Sul (milhões de kg) demonstrada no quadro 3 em anexo, mostra a variação da produtividade nas diferentes safras.

Denomina-se “vindima” a operação da colheita de uva para vinificação. Uma das preocupações iniciais para a elaboração do vinho consiste na fixação da data do início da vindima. Sua importância se deve a organização para o recebimento da uva, o que nem sempre é fácil de se estabelecer devido a inúmeros fatores (HASHIZUME, 2001).

A maturação ideal para a colheita da uva é constatada através do aspecto, da consistência e, principalmente, do teor de açúcar do mosto. A colheita deve ser feita quando o mosto apresentar a melhor relação açúcar/acidez, fator determinante da qualidade do suco. O acompanhamento da maturação da uva e a determinação do momento da colheita podem ser feitos através da observação visual ou gustativa, experimentando-se a uva. O melhor, no entanto, é determinar o teor de açúcar e de acidez a cada três dias, a partir de uma amostra de uva previamente colhida e representativa de todo o vinhedo. O teor de açúcar pode ser medido através do mostímetro (RIZZON *et al.*, 1998).

A uva destinada à produção de vinho é colhida segundo diferentes critérios, em função do tipo de vinho a ser elaborado e das condições climáticas. O critério mais utilizado é o do teor de açúcares. Sabe-se que, para a obtenção de 1°GL de álcool, são necessários 18g/L de açúcar na uva. Um vinho para que se conserve adequadamente,

deve conter, no mínimo, 11°GL, o que exige em sua elaboração uvas contendo pelo menos 20% (198g/L) de açúcar (GUERRA, 2003).

Outro parâmetro utilizado para determinar a data de colheita é a maturação fenólica, onde são quantificados as antocianinas e taninos. A extratibilidade das antocianinas e o teor de taninos das cascas, os quais conferem qualidade ao vinho, são tanto maiores quanto mais avançada estiver a maturação das bagas de uva. Este parâmetro é levado em consideração desde que se respeitem outros fatores importantes para a qualidade (como aromas e ácidos) a qual pode se perder se a colheita for realizada demasiadamente tarde (SILVA, 2010).

2.3.1 Melhoramento genético e novas cultivares brasileiras de uva

As condições ambientais das regiões vitícolas brasileiras, não são limitantes ao desenvolvimento da videira. Entretanto, em geral, são condições muito propícias ao desenvolvimento de doenças que atacam a parte aérea da planta, como antracnose (*Elsinoe ampelina*), míldio (*Plasmopara viticola*), oídio (*Uncinula necator*), podridões do cacho (*Botrytis cinerea*, *Glomerella cingulata*, *Greeneria uvicola*) e ferrugem (*Phakopsora euvtis*), entre outras. A adaptação às zonas de produção e resistência às doenças, aliadas à qualidade intrínseca dos diferentes produtos vitivinícolas, têm sido os temas prioritários no direcionamento dos programas de melhoramento. Outras características como produtividade, diferentes níveis de precocidade, menor demanda por mão-de-obra, adaptação a sistemas de produção orgânica e valor nutracêutico da uva e de seus derivados também são fatores importantes considerados atualmente nos programas de melhoramento. Os primeiros trabalhos de melhoramento genético da videira, no Brasil, foram iniciativas pessoais dos viticultores Pereira Barreto, Paulino Rech, Nicolau Martorano e Pedro Araújo. Mas foi o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) responsável oficial e pioneiro no melhoramento genético da videira, iniciando seu programa em 1938, na Estação Experimental de São Roque, ampliando-o a partir de 1940 com ações também na Estação Experimental de Jundiaí e em sua sede, em Campinas -SP. O programa de melhoramento do IAC ganhou impulso a partir de 1940, visando à criação de novos cultivares adaptados ao ambiente tropical, inspirado nos trabalhos de Fennell, desenvolvidos na Costa Rica. Este programa lançou diversos cultivares, destacando-se os porta-enxertos e uvas de mesa para regiões tropicais. No Rio Grande do Sul, os

primeiros trabalhos de melhoramento da videira foram conduzidos pelo pesquisador Moacyr Falcão Dias, na Estação Experimental de Caxias do Sul, a partir do final da década de 1950. Este programa gerou populações e materiais avançados, oriundos de diversos cruzamentos, mais tarde incorporados ao banco germoplasma da Embrapa (EMBRAPA, 2008).

De acordo com Da Silva (2010), a videira é atrativa para estudos genômicos porque é uma espécie diplóide, com 19 cromossomos. Os genótipos das variedades de videiras são altamente heterozigotos e aproximadamente todas as variedades modernas cultiváveis são hermafroditas, autofecundáveis e facilmente intercruzáveis.

Vitis vinifera foi a primeira espécie entre as frutíferas a ter seu genoma sequenciado, foi a quarta para plantas com flores, a segunda para uma espécie arbórea. A videira foi escolhida por causa de sua importância na herança cultural da humanidade durante o período Neolítico. Vários grupos de genes com características aromáticas foram observados. O genoma da videira permitiu a descoberta de três ancestrais ao conteúdo haplóide e as características da organização genética das plantas florescentes. Essa análise revela a cronologia dos eventos anteriormente descritos de todo o genoma de duplicação na evolução das plantas com flores (JAILLON *et al.*, 2007).

2.4 Efeitos benéficos

A procura cada vez maior por um estilo de vida saudável e a preocupação dos consumidores com a segurança dos produtos utilizados ou ingeridos, incluindo o consumo de produtos compostos por ingredientes naturais que ofereçam benefícios para o corpo, despertam um grande interesse das indústrias, tanto de alimentos como de fármacos e cosméticos, na obtenção e utilização de extratos vegetais que apresentem características funcionais (biológicas), corantes ou aromatizantes, com alto grau de pureza, uma vez que substâncias sintéticas, muitas vezes, são suspeitas de causarem efeitos maléficos à saúde. O isolamento desses compostos naturais possibilita o aproveitamento integrado de resíduos gerados na agroindústria e podem resultar em novas alternativas empresariais, além de minimizar o impacto ambiental causado pelo acúmulo desses resíduos (DE OLIVEIRA, 2010).

Vários efeitos benéficos à saúde têm sido atribuídos aos compostos fenólicos presentes nas frutas, hortaliças, chás e vinhos. Estudos epidemiológicos, clínicos e *in vitro* mostram múltiplos efeitos biológicos relacionados aos compostos fenólicos, tais

como: atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica (ABE *et al.*, 2007).

O consumo de uva e de seus subprodutos tem sido amplamente relatado como promotores de saúde. Este enfoque inclui esta fruta no conceito de alimentos funcionais, os quais são promotores de efeitos fisiológicos benéficos a saúde, notadamente na prevenção da ocorrência de riscos a algumas enfermidades. Os efeitos benéficos da uva tem sido relacionados principalmente aos compostos fenólicos que fazem parte de sua composição; sendo consideradas uma das maiores fontes destes compostos quando comparadas a outras frutas e vegetais (ABE *et al.*, 2007; HOGAN *et al.*, 2009; PINTO *et al.*, 2011).

O estudo dos compostos fenólicos da uva tem sido preocupação de pesquisadores cujos primeiros aportes decisivos se devem ao enólogo francês Ribéreau Gayon da década de sessenta. Na uva, os fenóis possuem um rol importante na qualidade e na maneira pela qual essas substâncias são transformadas durante a vinificação, influenciando direta e indiretamente sobre as características dos vinhos. Confere uma grande parte de sua estrutura, sua cor e suas propriedades sensoriais. Nos últimos anos os polifenóis dos vinhos têm sido sujeito de crescente interesse devido as suas propriedades antioxidantes e seus potenciais efeitos sobre a saúde (OJEDA, 2007). Fenólicos de uvas e vinhos tintos foram associados à inibição da oxidação do LDL (low-density lipoprotein) humano *in vitro*, à prevenção da aterosclerose e a efeitos antimutagênicos e antivirais (MOURE *et al.*, 2001).

Para Abe *et al.* (2007), a grande diversidade entre os cultivares resulta em uvas com diferentes características, tanto de sabor quanto de coloração, o que certamente está associado com o conteúdo e o perfil dos polifenólicos. Por serem a matéria-prima para a produção de vinhos e sucos, é importante conhecer os teores de compostos fenólicos das uvas, pois estes podem influenciar a qualidade dos produtos finais.

De acordo com Kaur *et al.* (2009), uvas e suco de uva são uma classe de produtos alimentares que têm demonstrado potencial quimiopreventivo, sendo também conhecidos por melhorar a saúde humana em geral. Em suas revisões, os autores enfocam os recentes avanços na eficácia anticâncer do extrato de sementes de uva e de outros produtos da uva. Completaram os estudos de vários grupos científicos, concluindo que ambos, uvas e seus produtos são excelentes fontes de diversos agentes anticancerígenos e seu consumo regular, pode melhorar a qualidade de vida.

De acordo com uma pesquisa da Universidade de Kentucky, (Lexington, EUA), 76% de células leucêmicas após serem expostas ao extrato de semente de uva, morreram em 24 h. Embora tenha sido mostrada a atividade do extrato de semente de uva em numerosas linhas de células cancerosas de laboratório, incluindo de pele, mama, cólon, pulmão, estômago e próstata, ainda não havia sido testado o extrato em células de câncer hematológico nem tinha sido mostrado o mecanismo preciso para atividade. Os resultados podem ter implicações para a incorporação de agentes como extrato de semente de uva na prevenção ou tratamento de malignidades hematológicas e possivelmente outros cânceres, conforme cita o autor principal do estudo (SHI *et al.*, 2008).

Vários estudos tem demonstrado que o suco de uva e o vinho contem compostos fenólicos em quantidades consideráveis e que, portanto, seu consumo é desejável como aporte de substâncias antioxidantes naturais. O consumo de suco de uva como fonte de compostos fenólicos pode apresentar vantagem em relação ao do vinho, já que a ausência de álcool permite que seja consumido pela maioria das pessoas, inclusive aquelas portadoras de algumas enfermidades ou com restrições de ordem filosófica, cultural ou religiosa (MALACRIBIA e MOTTA, 2005; PINTO *et al.*, 2011).

Shin *et al.* (2010) investigaram o efeito protetor das proantocianidinas da semente de uva em lesões hepáticas induzidas pelo dimetilnitrosamina (DMN) em ratos e concluíram que elas podem ser úteis na prevenção do desenvolvimento de fibrose hepática.

O resveratrol (3,5,4-trihidroxi-trans-estilbeno) é uma substância biologicamente ativa. Pode ser encontrado na natureza sob a forma aglicosídica ou glicosídica, tendo esta última diferentes denominações, dependendo da glicona envolvida e da forma geométrica (trans e cis). Está presente em diversas plantas, em especial na uva e em seus derivados. Essa substância faz parte de um conjunto de compostos chamados de fitoalexinas, produzidos pela casca da uva para proteger-se de fungos, danos mecânicos ou irradiação ultravioleta (FILIP *et al.*, 2003).

A atividade antioxidante do resveratrol já foi comprovada, protegendo as células e impedindo a oxidação dos ácidos graxos presentes nos triglicerídeos associados ao colesterol de baixa densidade (LDL), reduzindo a ocorrência de distúrbios cardiovasculares. As fontes mais abundantes de resveratrol são as uvas *Vitis vinifera*, *V.*

labrusca e *V. muscadine* que são usadas na fabricação de vinhos (MANOSSO, 2008; IURKO *et al.*, 2008).

Descobertas científicas publicadas nos últimos anos promovem o consumo contínuo e moderado de vinho para se prevenir determinadas doenças. A atividade antioxidante do resveratrol presente no vinho, por exemplo, auxilia no tratamento de doenças cardiovasculares e na prevenção do acúmulo de colesterol, tem comprovada a ação bactericida e antiviral, estimula o apetite, facilita a digestão e retarda o envelhecimento celular e orgânico, além de possuir efeito contra o câncer (SAUTTER *et al.*, 2005; GUERRA, 2010).

Por ser um antioxidante natural, sua aplicação em alimentos traz uma série de benefícios, o que levou à realização de estudos sobre seu efeito antioxidante na peroxidação de lipídios e à sua comparação com outros antioxidantes. Em geral, apresenta bons resultados nesse campo, dependendo da concentração, chegando a ser mais efetivo que o butilhidroxitolueno (BHT), a quercetina, a vitamina C e o α -tocoferol (vitamina E). Apresenta também efeito sinérgico na associação com a vitamina C e/ou com a vitamina E, possui efeito antioxidante superior ao efeito de cada uma destas substâncias isoladamente (BAXTER, 2008).

Recentemente foram relatadas outras importantes propriedades biológicas do resveratrol, como melhorar a tolerância à glicose em diabéticos, atenuar os sintomas da menopausa (devido à semelhança de sua estrutura molecular com a do estrogênio sintético) e proteger contra a osteoporose e mal de Alzheimer (BAXTER, 2008; DAVID *et al.*, 2007).

Segundo Guerra (2010), apesar de ser uma bebida alcoólica, o consumo contínuo e moderado do vinho tem sido estimulado por médicos e outros profissionais da saúde. Os efeitos positivos do vinho tinto sobre a saúde humana são discutidos, aceitos e descritos em textos da legislação em diversos países produtores. A organização Internacional da Uva e do Vinho (OIV) possui em seus quadros científicos, especialistas que estudam continuamente os efeitos de centenas de compostos orgânicos e minerais do vinho.

2.5 Composição química

Os compostos fenólicos são substâncias metabólicas secundárias produzidas e acumuladas em tecidos de plantas. Este acúmulo dependerá de vários fatores, como a

variedade da uva, as reações que ocorrem durante o processo de maturação, o clima de cada região específica e finalmente o estresse pelo qual esta planta é submetida. (SOLEAS *et al.*, 1997).

A uva é fonte de diversos compostos fenólicos em elevadas concentrações e os subprodutos da vinificação, em sua maioria, podem manter quantidades apreciáveis dessas substâncias como os flavonóides (antocianinas, flavanóis e flavonóis), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos) e uma larga variedade de taninos. Quimicamente, os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (DE OLIVEIRA, 2010; ROCKENBACH, 2008). Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos de substâncias: a) ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C6-C1); são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza, como os ácidos gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e siríngico; b) ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C6-C3), considerando a variedade da uva e o modo de vinificação, são conhecidos como os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sinápico (BALASUNDRAM *et al.*, 2006; ROCKENBACH, 2008).

A composição química dos bagaços varia de acordo com as condições climáticas, os sistemas de condução da vinha e o estado sanitário das uvas no momento da vindima (ROCKENBACH *et al.*, 2008).

A composição do mosto de uva fresca, sã e madura é variável e encontra-se representada no **Quadro 1**, em anexo.

Os principais ácidos encontrados na uva são: o ácido tartárico, o ácido málico e o ácido cítrico (TOMASSET, 1998). A maior acidez da uva se deve ao ácido tartárico, é característico e típico desta fruta, não encontrado naturalmente em outros frutos, é acumulado durante os estágios iniciais do desenvolvimento do fruto e sua concentração é mais alta na periferia do fruto em desenvolvimento. Em contraste, o ácido málico é acumulado em células da polpa no final da primeira fase de desenvolvimento. Esses ácidos conferem acidez para o vinho e são, dessa forma, críticos para sua qualidade (DA SILVA, 2010). O ácido múcico é uma exceção, que se encontra unicamente em casos particulares de uva atacada por fungos, e que contém um sal de cálcio pouco solúvel, o ácido tartárico é o único ácido orgânico que gera problemas de estabilidade no vinho por causa de seus sais pouco solúveis (TOMASSET, 1998).

Ácidos graxos estão presentes em pequenas quantidades, mas tem papel de precursores de substâncias aromáticas. São os seguintes os ácidos graxos encontrados na uva: palmítico, esteárico, oléico, linoleico e linolênico. As proporções entre eles variam com o cultivar (GIOVANNINI e MANFROI, 2009).

2.5.1 Compostos fenólicos

A uva e o vinho contêm uma grande quantidade de compostos derivados da estrutura básica do fenol (hidroxibenzeno) e de duas classes distintas: os fenóis não flavonóides e os flavonóides. O conteúdo total de fenol no vinho é menor do que o da fruta. Os flavonóides constituem o maior grupo de compostos fenólicos de plantas, sendo responsáveis pela coloração das flores e dos frutos. São substâncias de baixo peso molecular compostas de 15 átomos de carbono. Nas videiras, são responsáveis pela coloração das cascas das uvas tintas e se transferem, em parte, para o vinho durante a vinificação, sendo encontradas também na polpa de algumas variedades de uvas (ROCKENBACH, 2008).

Os compostos fenólicos desempenham diversas funções na uva e nos vinhos, sendo responsáveis pela cor (antocianinas, flavonas), adstringência (tanino), amargor (tanino), contribui para o perfil olfativo (ácidos fenólicos, catequinas e taninos antocianogênicos), atua como reservatório de oxigênio e substratos para reações de escurecimento (ZOECKLEIN *et al.*, 2001). Também são considerados importantes para a higiene do vinho, por sua ação bactericida, bem como para seu envelhecimento, uma vez que este processo promove agregação destes compostos e conseqüente variação de aroma e sabor (SCHLEIER, 2004; TIMM *et al.*, 2012).

O conteúdo total de polifenóis no vinho depende de uma série de fatores como variedade da uva (tinta ou branca), tipo de extração, inclusão ou eliminação de partes específicas como casca, polpa ou sementes, na etapa anterior à fermentação, se houve ou não aquecimento das cascas, processo de vinificação (temperatura e tempo de maturação) e envelhecimento (SCHLEIER, 2004; TIMM *et al.*, 2012). Longos períodos de fermentação em que sementes e cascas ficam imersas levam à obtenção de níveis mais altos de compostos fenólicos, com o álcool produzido agindo como líquido extrator (CAMARGO, 1996; SOLEAS *et al.*, 1997; ECHEVERRY *et al.*, 2004 citado por TIMM *et al.*, 2012).

De acordo com Barceló (1990), atualmente a quantidade de fenóis totais no vinho está muito abaixo do conteúdo que existia anos anteriores, devido às técnicas de elaboração que evitam o contato prolongado com as partes da uva que cediam estes compostos (casca, polpa, sementes). A concentração aumenta proporcionalmente ao tempo de contato com a casca e com as sementes, a graduação alcoólica, temperatura de fermentação, agitação, intensidade do prensado, variedade da uva, etc. Os componentes que contribuem para o bouquet dos vinhos tintos são os flavonóides, as antocianinas, ácidos fenólicos, catequinas e taninos antocianogênicos.

Os compostos fenólicos exercem atividade antimicrobiana lesando as membranas plasmáticas lipídicas, o que resulta em vazamento de conteúdo celular. Uma propriedade útil dos compostos fenólicos enquanto desinfetantes é que permanecem ativos em presença de compostos orgânicos, são estáveis e persistem por longos períodos após a aplicação. Por esses motivos, os compostos fenólicos são agentes apropriados para desinfecção de pus, saliva e fezes (TORTORA *et al.*, 2012). A ação bactericida se deve aos ácidos fenólicos e flavonóides. Tem ação anti-vírus resultante da ação combinada de taninos e proteínas. Apresentam também ação anti-aterosclerose, devida às catequinas condensadas que reforçam a parede das artérias, aceleram a depuração do colesterol e se opõem à produção de histaminas (GIOVANNINI e MANFROI, 2009).

Os taninos são compostos fenólicos, polímeros de fenóis tanto flavonóides, como não flavonóides, caracterizados por sua capacidade de se combinar com as proteínas e outros polímeros como os polissacarídeos. Esta característica explica suas propriedades para curtir peles tornando-as imputrescíveis ao reagir com o colágeno e explica também sua adstringência causada pela precipitação das proteínas e das glicoproteínas da saliva (TOMASSET, 1998; ZOECKLEIN *et al.*, 2001).

Segundo Giovannini e Manfroi (2009), os frutos verdes contem grandes quantidades de tanino, que vão sendo hidrolizados durante o amadurecimento e mesmo durante o armazenamento das uvas. Na uva madura, os taninos se encontram fundamentalmente nos engaços e nas sementes.

Abe *et al.* (2007) determinaram o conteúdo de compostos fenólicos, incluindo resveratrol, antocianinas e outros flavonóides, e a capacidade antioxidante de cinco cultivares de uvas produzidas em Minas Gerais. O conteúdo de fenólicos totais, determinado através do método de Folin-Ciocalteu variou significativamente. Outros flavonóides encontrados foram catequina, epicatequina, quercetina, caempferol além

dos ácidos hidroxicinâmicos. O resveratrol foi encontrado em três cultivares. A capacidade antioxidante foi analisada usando o método de seqüestro de radicais livres do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), mostrando boa correlação com o conteúdo de fenólicos totais. As uvas tintas de coloração mais escura apresentaram maior conteúdo de antocianinas, e conseqüentemente maior teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante.

2.5.2 Antocianinas

A maioria das milhares de cultivares de videira (*Vitis vinifera* L.), podem ser divididas em dois grupos, tintos e brancos, com base na presença ou ausência de antocianina na casca. A partir de experiências genéticas foi encontrado um gene regulador, que pode ativar a biossíntese de antocianina. Foi recentemente demonstrado não ser transcrito em uvas brancas. O gene alelo de uvas brancas é inativado por duas mutações não conservativas, uma conduz a uma substituição de um aminoácido e o outro para uma mudança resultando numa proteína pequena. Ensaios experimentais mostraram que a mutação seja removendo a capacidade do gene regulador para ligar a biossíntese de antocianina, seja por análises de seqüência, juntamente com informações do marcador, confirmou que 55 cultivares brancas contêm o gene alelo branco, mas não alelos tintos. Estes resultados sugerem que todas as cultivares brancas existentes de vinhas têm uma origem comum. Conclui-se que os eventos de mutação rara que ocorre em dois genes adjacentes foram fundamentais para a gênese das uvas brancas usadas para produzir os vinhos brancos e uvas de mesa brancas que temos atualmente (WALKER *et al.*, 2007).

Dentre os compostos flavonóides, as antocianinas são as substâncias responsáveis pela coloração de muitas frutas e flores. Em uvas estão concentradas principalmente na casca, estando presente também nas folhas, sobretudo no final do ciclo vegetativo (RIBÉREAUGAYON *et al.*, 2003). As antocianinas atuam como filtro das radiações ultravioletas nas folhas. Em certas espécies de plantas estão associadas com a resistência aos patógenos e atuam melhorando e regulando a fotossíntese (MALACRIDA e MOTTA, 2006).

A cor das uvas tintas se atribui a presença destes pigmentos vegetais, que se encontram em forma de glicosídeos, sendo que as agliconas são conhecidas como

antocianidinas. As antocianidinas tem como estrutura básica o cation 2-fenilbenzopirilium, também denominado flavilium (ZOECKLEIN *et al.*, 2001; PINTO *et al.*, 2011).

As antocianinas têm despertado interesse como corantes, mas, tem chamado a atenção para o fato de sua capacidade antioxidante ser maior que a vitamina E, o butil hidroxianisol (BHA) e o butil hidroxitolueno (BHT). Por serem fortemente polares, podem substituir os antioxidantes lipofílicos como, por exemplo, a vitamina E (ROCKENBACH, 2008). Além disso, estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo* demonstraram a capacidade das antocianinas de reduzir a proliferação de células cancerígenas e inibir a formação de tumores (HOU, 2003).

Das seis antocianidinas, apenas a pelargonidina não é encontrada nas uvas (PINTO *et al.*, 2011).

Os cinco tipos de antocianídeos na videira permite a distinção entre viníferas que possuem somente monoglicosídeos, e americanas e/ou híbridas, que também possuem diglicosídeos. São elas: malvidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo. A primeira representa o principal pigmento da uva, no mínimo 50% do teor total. As antocianinas estão presentes principalmente nas primeiras camadas de células da casca da uva, sendo extraídas nos primeiros dias da maceração na vinificação em tinto. São poucas as variedades cuja polpa também é pigmentada. São os pigmentos responsáveis pela cor do vinho tinto recém elaborado. Durante a fermentação e a estabilização, reagem quimicamente com os flavonóis e outros compostos do vinho, formando produtos polimerizados, quimicamente estáveis, os quais são diretamente responsáveis pela longevidade dos vinhos (FALCÃO *et al.*, 2007; GIOVANNINI E MANFROI, 2009; GUERRA, 2010).

De acordo com Vigara e Amores (2010), outras espécies americanas (*V. riparia*, *V. rupestris*) possuem antocianinas diglicosídeos, o que permite descobrir vinhos comercializados com denominação de origem, que procedem de variedades híbridas. O caráter “presença de diglicosídeo” é dominante e segundo as leis da genética, o cruzamento entre a varietal *V. vinifera* e uma espécie americana, dá origem a indivíduos que possuem o caráter “presença de diglicosídeo”. Um segundo cruzamento entre um produto híbrido direto com uma varietal *V. vinifera* pode não manifestar o caráter “presença de diglicosídeo”, a maioria dos híbridos o possuem. A distinção consiste em

testar a presença de diglicosídeo, já que é possível ainda que a proporção destas seja muito baixa. Deste modo se evitam fraudes consistentes em comercializar vinhos procedentes de *V. vinifera* elaborados a partir de variedades que não são.

O mecanismo da degradação térmica das antocianinas ainda não foi completamente elucidado. O aquecimento das antocianinas, para valores de pH entre 2,0 e 4,0, provoca primeiramente a hidrólise da ligação glicosídica com posterior formação da chalcona. Além disso, existem evidências de que a hidrólise glicosídica das antocianinas seja a principal causa da perda de cor, uma vez que a velocidade da liberação do açúcar é proporcional à velocidade da perda da cor vermelha (MALACRIDA e MOTTA, 2006).

Embora a extração a quente facilite a solubilização das antocianinas da casca da uva para o suco, o aquecimento excessivo deve ser evitado. Longos períodos de extração em altas temperaturas podem acarretar decréscimo das antocianinas do suco devido reações de degradação ou condensação com taninos (RIBÉREAU-GAYON, 1982).

Antocianinas apresentam potencial para substituição dos corantes artificiais vermelhos; porém, estes se apresentam instáveis frente ao processamento de alimentos, sendo a temperatura um dos principais fatores envolvidos na degradação da cor destes pigmentos (FALCÃO *et al.*, 2007).

2.5.3 Taninos

Apresentam-se em dois grupos, com base no seu tipo estrutural: taninos hidrolisáveis e os taninos condensados, atualmente denominados proantocianidinas. Os taninos condensados estão altamente distribuídos nas plantas, são polímeros de alto peso molecular, derivados da polimerização das catequinas, que são as unidades flavanólicas básicas. Já os taninos hidrolisáveis também são denominados galotaninos e elagitaninos, em função de liberarem ao meio maior quantidade de ácido gálico ou ácido elágico, após hidrólise ácida. Os taninos são insolúveis em solventes apolares (éter, clorofórmio e benzeno) e pouco solúveis em acetato de etil. Devido à presença de grande número de grupos polares, eles dissolvem-se prontamente em água e álcool, formando “sóis coloidais” (BARCELOS, 2004; MANFROI *et al.*, 2010).

De acordo com Ribéreau-Gayon *et al.* (2006), o conteúdo de taninos é o fator mais importante na estabilização da cor no vinho. As antocianinas livres desaparecem completamente após alguns anos, embora o vinho continue vermelho devido à combinação destas moléculas com taninos.

Os principais constituintes fenólicos presentes nas uvas são, por ordem crescente em termos de concentração: os flavonóis, os ácidos fenólicos, as antocianinas, as catequinas e as proantocianidinas (corresponde atualmente à designação que até alguns anos era dada aos taninos condensados). A relevância destes compostos, ao nível do seu papel e função nos produtos de origem vegetal, tem merecido grande destaque nos últimos anos, não só devido a Enologia, como também dos seus potenciais benefícios para a saúde humana (JORDÃO, 2000).

De acordo com Deshpande *et al.* (1986), os efeitos prejudiciais dos taninos na dieta parecem estar relacionados com as suas interações com as proteínas alimentares. Acredita-se que o complexo 'proteína-tanino' seja um dos responsáveis pela depreciação do crescimento animal, baixa digestibilidade protéica e aumento do nitrogênio fecal, sendo que o teor de nitrogênio das fezes geralmente aumenta em proporção à quantidade de taninos oferecida. Taninos também inibem enzimas importantes, como tripsina e amilases. Contribuem ainda com a adstringência do alimento e participam de reações de escurecimento enzimático.

2.6 Uva Isabel

Entre os cultivares norte americanos e híbridos destaca-se o cultivar 'Isabel', que representa quase metade de toda a uva processada no Brasil. Este cultivar é utilizado basicamente para todos os fins: para produção de vinho de mesa e suco de uvas, consumo *in natura* e elaboração de geléias (RIZZON *et al.*, 1998; MAIA e CAMARGO, 2005; DA SILVA, 2010b). Variedade de *V. labrusca*, é para alguns autores considerada híbrido espontâneo de *V. labrusca* e *V. vinifera*. Originária dos Estados Unidos, provavelmente do Estado da Carolina do Norte, é a variedade mais extensamente cultivada no Brasil, ocupando quase a metade da área do vinhedo nacional, (DA SILVA, 2010b).

Americanos e europeus registram a grafia 'Isabella', nome dado por William Prince, em 1816, que a havia recebido de Isabella Gibbs, do estado de New York. É também conhecida como americana, nacional, e uva manga em nosso país. 'Isabelinha'

e 'Bellina' na Ilha da Madeira. 'Brasileña' e 'Frutilla' no Uruguai. Uva 'Chinche' na Argentina; 'Guavirami' no Paraguai; 'Fragola' e 'Framboesa' na Itália; 'Zéphyrin' e 'Saint Helen' na França; 'Strawberry' na Inglaterra (RIZZON *et al.*, 1998; SOUZA, 2002b).

A uva 'Isabel' é altamente resistente à antracnose e às podridões, sendo tolerante ao mídio. Sua produtividade é de 20 a 30 t/ha, com elevado teor de açúcar na baga, podendo variar em função das safras, entre 15 a 19° Brix e acidez total média de 45 meq/L. Produz mosto regular, porém de pouca cor (RIZZON *et al.*, 1998; GIOVANNINI, 2008).

Planta vigorosa, produzindo em média de 1 a 2 kg/m², suporta bem a poda curta, na condução em espaldeira, embora o principal sistema seja a latada. Maturação tardia, junto com 'Niágara' ou até depois desta. Os cachos são médios, cônicos e pouco compactos, pesando em média 200 a 250g. As bagas são médias, arredondadas, de cor preto-azulada, coberta de abundante pruína (MANICA e POMMER, 2006).

É um cultivar de uva tinta, altamente fértil, proporcionando colheitas abundantes e com poucas intervenções de manejo. Tem o sabor característico das labruscas. Além das utilizações já citadas, é a matéria-prima para a elaboração de vinagre e para o fabrico de doces. É o cultivar mais plantado no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina (MAIA e CAMARGO, 2005). Apesar de todos os esforços para substituir este cultivar desde a década de 1930, 'Isabel' persiste com 50% da uva produzida no Rio Grande do Sul. Muito bem adaptada às condições climáticas do estado, fornece produções abundantes com limitado número de tratamentos fitossanitários. Vinhedos cultivados em pé-franco atingem 80-100 anos com produções econômicas. Origina vinho foxado, em anos chuvosos pouco coloridos, apreciado por uma faixa de consumidores. O suco de 'Isabel' é a base do suco brasileiro para exportação. É uma cultivar de *Vitis labrusca* (CAMARGO, 2008).

2.6.1 Uva Isabel Precoce

Trata-se de um clone da 'Isabel' selecionado pela Embrapa Uva e Vinho, lançado como novo cultivar em 2002. Este cultivar de uva tinta é recomendado como alternativa para a elaboração de vinho de mesa, suco de uva e também como opção para o consumo *in natura*. Apresenta as características gerais da 'Isabel', porém, tem maturação mais precoce, sendo a colheita antecipada em cerca de 35 dias. Diferentemente do cultivar 'Isabel', na qual é comum a presença de bagas verdes entremeadas no cacho maduro, a

'Isabel Precoce' apresenta maturação uniforme. A área cultivada com 'Isabel Precoce' vem crescendo tanto no Rio Grande do Sul como em novos pólos de produção de vinhos de mesa e de sucos das regiões Centro-Oeste e Nordeste do Brasil. É um cultivar com ampla capacidade de adaptação (MAIA e CAMARGO, 2005).

2.7 Uva Bordô

A 'Bordô' é uma variedade de *Vitis labrusca*, originalmente chamada de 'Ives Seedling' ou simplesmente 'Ives', obtida em Cincinnati, Estados Unidos, por Henry Ives, a partir de sementes de Hartford Prolific (SOUZA e MARTINS, 2002).

No Brasil é conhecida por nomes regionais, 'Bordô' no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina; 'Terci' no Paraná; 'Folha de Figo' em Minas Gerais. Este cultivar de uva tinta tem importância comercial só em regiões com inverno definido, apresentando grande dificuldade de desenvolvimento em climas tropicais. Assim, a recomendação de cultivo está restrita aos pólos do Sul de Minas Gerais e Norte do Paraná, além dos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. É um cultivar muito produtivo, rústico e resistente a doenças fúngicas, normalmente plantado de pé-franco. A uva apresenta alta concentração de matéria corante, motivo principal de sua significativa difusão. É muito disputada entre os vinicultores devido ao elevado teor de matéria corante do vinho, usado em cortes com os vinhos pouco coloridos de 'Isabel'. Da mesma forma, também é disputada pela indústria de suco com o mesmo objetivo, de corrigir a coloração de sucos elaborados com 'Isabel' e 'Concord' (MAIA e CAMARGO, 2005; CAMARGO, 2008).

Embora em certa época, teve expressão na viticultura norte-americana, hoje seu cultivo limita-se ao Brasil. A maior concentração de uva 'Bordô' está no Rio Grande do Sul, onde atualmente, em termos de área, é a segunda casta em ordem de importância, sendo superada apenas pela 'Isabel', devido a sua crescente participação na elaboração de sucos, originando produtos de excelente qualidade (SOUZA e MARTINS, 2002; CAMARGO, 1996).

2.8 Uva Moscato

É o cultivar vinífera de uvas brancas com maiores áreas e produção no Rio Grande do Sul. É vigoroso e muito produtivo; a uva apresenta acentuado sabor e aroma moscatel, motivo da grande procura por parte do setor vinícola que a utiliza para a elaboração de vinhos destinados a cortes com outros vinhos brancos. É bastante sensível às podridões do cacho (CAMARGO, 2008).

Originária provavelmente da Grécia e cultivada há muito tempo na Itália; antigamente era conhecida por "Apianae", que significa a que as abelhas tem predileção devido ao alto teor de açúcar da uva. Ainda por volta de 1360 já era conhecida a prática de adicionar, durante a fermentação alcoólica, uma quantidade de flores de sabugueiro secas à sombra para aumentar o aroma de moscato do vinho. O cultivar apresenta folha de tamanho médio, trilobada ou quinquilobada com seio peciolar em lira. A coloração outonal das folhas é amarelo com aspecto dourado. O cacho é de tamanho médio, compacto, de formato cilindro-cônico, geralmente com uma e em alguns casos duas asas. A baga apresenta tamanho médio, de formato esférico, umbigo saliente e persistente; a casca é pouco pruinosa de cor amarelo dourado, tornando-se âmbar na parte exposta ao sol. O sabor do mosto além de doce apresenta o típico gosto amoscato. A baga se separa facilmente da ráquis e apresenta de duas a três sementes. Na Itália, o cultivar 'Moscato Branco' é plantada na região de Asti, Alexandria e Cuneo cujo centro é Canelli com altitude que varia de 100 m a 400 m, sendo que a maior área se encontra numa altitude média de 200 m. Ele é denominado segundo a região produtora: 'Moscato d'Asti', 'Moscato di Trami', 'Moscato di Saracusa', 'Moscato di Tempio'. Na Serra Gaúcha, o vinho Moscatel Espumante é elaborado a partir de cultivares de *Vitis vinifera*, aromáticas de sabor moscato. A Portaria número 229, de 25 de outubro de 1988, que regulamenta a Lei 5.823 de 14 de novembro de 1973, determina que o vinho "Moscatel Espumante" seja elaborado com mosto de cultivares de *Vitis vinifera* (RIZZON e GASPARIN, 2008)

2.9 Uva Niágara Rosada

A uva "Niágara Rosada" apresenta-se como uma das principais uvas consumidas no Brasil, por ter alta qualidade para o consumo *in natura*, bem como ao baixo custo de produção, o que tem permitido grande expansão na área cultivada. Juntamente com a 'Isabel', são destaques como uvas de mesa comuns. São variedades rústicas menos exigentes em tratos culturais e, por serem mais tolerantes às doenças fúngicas, estão bem adaptadas às condições de clima úmido, podendo ser cultivada no sistema orgânico, onde não são realizadas aplicações de defensivos químicos (DETONI *et al.*, 2005).

Pesquisadores da Embrapa Uva e Vinho, em Bento Gonçalves - RS, desenvolveram uma técnica de produção orgânica da uva 'Niágara Rosada' que garante alta produtividade, sem a utilização de agroquímicos. Essa forma de produzir é mais ecológica, o que gera um produto mais saudável para o consumidor e mais atrativo para o mercado. Os principais pontos trabalhados nesse sistema de cultivo são: a prevenção de doenças, o manejo do solo, o manejo da planta e a adubação. Há dois sistemas de produção, com ou sem cobertura plástica. O pesquisador destaca, contudo, que o sistema de cobertura plástica evita doenças e pode melhorar a produtividade. (MELO, 2012).

2.10 Resíduos da agricultura

O Brasil possui economia fortemente baseada na agroindústria. Dados do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada fornecem uma dimensão da importância da indústria agropecuária para o país: em 2009, a participação do PIB do agronegócio no PIB do país foi de 23,08%. O desempenho do agronegócio em 2012 foi marcado por diferentes cenários ao longo do ano; problemas climáticos adversos (seca no período de desenvolvimento das culturas e excesso de chuva na época da colheita) seguiram prejudicando a produtividade de diversas lavouras. Com a expansão da demanda no final do ano, o segmento industrial do agronegócio seguiu crescendo em dezembro: +0,54%. (CEPEA, 2012; 2013).

Segundo Martin (2011), a tendência é que a produção de alimentos cresça no mundo todo, pois a produção mundial de alimentos precisa crescer 70% até 2050 para

garantir o abastecimento a níveis seguros. Conseqüentemente, essa crescente produção acarretará no aumento da geração de resíduos e subprodutos.

Estes resíduos, por sua vez, representam um grave problema, pois aparentemente sem aplicação viável, são descartados diretamente ao meio ambiente. Muitos deles são ricos em compostos bioativos, amplamente reconhecidos pelas suas propriedades promotoras de saúde e aplicações tecnológicas, tais como antioxidantes e antimicrobianos, representando portanto, potenciais fontes naturais destas substâncias (MELO, 2010).

Estão sujeitas à observância da lei nº 12.305, de 02 de agosto de 2010, as pessoas físicas ou jurídicas, de direito público ou privado, responsáveis, direta ou indiretamente, pela geração de resíduos sólidos e as que desenvolvam ações relacionadas à gestão integrada ou ao gerenciamento de resíduos sólidos. Para os efeitos desta lei, entende-se por destinação final ambientalmente adequada, as que incluem a reutilização, a reciclagem, a compostagem, a recuperação e o aproveitamento energético ou outras destinações admitidas pelos órgãos competentes; entre elas a disposição final, ambientalmente adequada: distribuição ordenada de rejeitos em aterros, observando normas operacionais específicas de modo a evitar danos ou riscos à saúde pública e à segurança e a minimizar os impactos ambientais adversos (BRASIL, 2010).

A compostagem é a “reciclagem dos resíduos orgânicos”, forma de recuperar os nutrientes dos resíduos através de um processo biológico que acelera a decomposição do material orgânico e leva-os de volta ao ciclo natural, enriquecendo o solo para agricultura (BRASIL, 2013).

Kiehl (1985) relata que durante o processo de compostagem é possível observar três fases distintas: uma primeira inicial e rápida, seguida de uma segunda fase de semi-cura ou bioestabilização, para atingir finalmente a terceira fase, a humificação, acompanhada da mineralização de determinados componentes da matéria orgânica.

Para que todo ciclo esteja completo são necessários aproximadamente de 90 a 120 dias após mistura dos materiais orgânicos (dependendo da relação C: N do resíduo), tendo como resultado um composto normalmente escuro e de textura turfa, utilizado como condicionador de propriedades físicas e biológicas do solo, assim como, um composto fertilizante que fornece os nutrientes essenciais para o suprimento das plantas (CERRI, 2008).

A aplicação de diferentes tipos de resíduos na agricultura é uma prática que está sendo utilizada tanto para benefício do solo, como para destino de grandes quantidades

de rejeitos. Antes de ser utilizado na agricultura, o resíduo, de qualquer procedência, deve ser analisado para verificar se em sua composição não há substâncias e microorganismos em quantidades elevadas, que possam vir a prejudicar o solo e os aquíferos subterrâneos. Aqueles que não atenderem às especificações determinadas pelos órgãos responsáveis pelo controle ambiental, mesmo após tratamentos, não poderão ser utilizados, devendo ser disposto em locais apropriados, como os aterros sanitários (FALCÃO, 2005).

Segundo De Oliveira (2010), ainda que haja toda a riqueza da flora brasileira e do potencial para o aproveitamento de resíduos da agricultura e da agroindústria, no país ainda há poucos investimentos em tecnologias capazes de agregar valor a esses subprodutos. No entanto, atualmente, as exigências governamentais e do mercado consumidor vêm acarretando custos cada vez maiores para o tratamento dos resíduos gerados pelas indústrias de alimentos, o que aumenta a importância do desenvolvimento de tecnologias que possibilitem o reaproveitamento desses resíduos, ao mesmo tempo em que sejam ambientalmente seguros e garantam a qualidade dos produtos.

O Brasil, por ser um país de grande atividade agrícola, é um dos que mais produzem resíduos agroindustriais. Produtores e indústrias enfrentam o problema de descarte da biomassa residual que, embora seja biodegradável, necessita de um tempo mínimo para ser mineralizada, constituindo-se numa fonte de poluentes ambientais (CORRÊA, 2011).

Dentre os diversos resíduos gerados pela agroindústria brasileira, destacam-se os vinícolas por serem ricas fontes de compostos fenólicos e pela expressiva quantidade resultante do processamento, já que bagaço (cascas e sementes), engaço e a borra do processo fermentativo representam em média 30% do volume de uvas utilizadas para a produção vinícola (MELO *et al.*, 2011).

Embora recente, o setor vitivinícola brasileiro tem avançado tanto nos produtos elaborados quanto na produção de uvas destinadas ao consumo in natura, o que o torna uma promissora fonte de substâncias bioativas naturais. Ainda que os produtos da uva, sucos e vinhos, sejam mundialmente reconhecidos pela composição química que apresentam, principalmente com relação as suas substâncias antioxidantes, pesquisas envolvendo resíduos do processamento de uvas são mais recentes e representam um campo científico com muito a ser explorado. Os primeiros estudos envolvendo subprodutos da vinificação atrelaram-se quase que exclusivamente na composição polifenólica das sementes e mais atualmente têm se dada grande importância também ao

bagaço gerado. Entretanto, os demais resíduos provenientes do processo, tais como o engaço e a borra da fermentação ainda têm recebido pouca atenção (MELO 2010).

A recuperação de compostos antioxidantes a partir dos descartes contínuos da indústria de vinho poderia representar um avanço significativo na manutenção do equilíbrio do meio ambiente, visto que, para as vinícolas, as grandes quantidades de resíduos gerados apresentam sérios problemas de armazenagem, de transformação, ou de eliminação, em termos ecológicos e econômicos. Essa situação explica o interesse crescente em explorar e agregar valor aos subprodutos da vinificação, rico em propriedades biológicas relevantes para as indústrias farmacêuticas, químicas e alimentícias (ALONSO *et al.*, 2002; LOULI *et al.*, 2004; ROCKENBACH *et al.*, 2008).

2.11 Resíduos da vinificação

Os principais subprodutos da vinificação são separados durante as etapas de esmagamento e prensagem das uvas, e apenas pequenas quantidades desses resíduos são valorizados ou aproveitados (TORRES *et al.*, 2002). A recuperação de compostos a partir dos rejeitos das indústrias de vinho e suco poderia representar um avanço significativo na manutenção do equilíbrio ambiental, visto que nas vinícolas as grandes quantidades de resíduos gerados causam sérios problemas de armazenagem, transformação ou eliminação, em termos ecológicos e econômicos. Esta situação explica o interesse crescente em explorar e agregar valor aos subprodutos da vinificação ricos em propriedades biológicas relevantes para as indústrias farmacêuticas, químicas e alimentícias (DE OLIVEIRA, 2010).

Também é válido ressaltar que além de proporcionar fonte de matéria-prima para pesquisas de novos compostos bioativos, a reutilização destes resíduos ajuda a depletar os danos ambientais. Resíduos agroindustriais apresentam elevada composição orgânica. Seu descarte no meio ambiente é fonte de sérios problemas; a liberação excessiva de nutrientes como fósforo e nitrogênio, pode causar eutrofização de ambientes aquáticos, com conseqüente diminuição de oxigênio dissolvido, causando morte de organismos aeróbios e desequilíbrio do ecossistema local (MARTIN, 2011).

Os resíduos da vinificação: engaço de cachos (**Fig 03**, em apêndice), bagaço de cascas e sementes de uvas (**Fig 04**, em apêndice), disponíveis em empresas ou propriedades produtoras de vinho, devem ser utilizados para a elaboração de compostos

orgânicos. Normalmente esses materiais se acumulavam no ambiente por um longo período de tempo, até sofrerem um processo natural de decomposição pela ação de chuvas e temperatura (ALBUQUERQUE *et al.*, 2006).

Quanto à origem, se classificam em resíduos agrossilvopastoris, gerados nas atividades agropecuárias e silviculturais, incluídos os relacionados a insumos utilizados nessas atividades, e resíduos industriais, gerados nos processos produtivos e instalações industriais (BRASIL, 2010).

Da industrialização dos subprodutos da vinificação surgem diversos produtos, destacando-se a aguardente, o álcool etílico, o óleo de semente de uva e o ácido tartárico (DA SILVA, 2003).

O bagaço, produto resultante da prensagem das massas vínicas, é o principal subproduto da vinificação, não só pela riqueza alcoólica e tartárica, mas também pelo interesse econômico de alguns dos seus componentes físicos (DA SILVA, 2002). A maior parte desse resíduo é usada para ração animal ou adubo; sendo assim, pesquisas que permitam sua utilização para obtenção de compostos bioativos podem representar um ganho econômico significativo (DE OLIVEIRA, 2010).

O bagaço de uva representa uma importante fonte de óleo. As sementes de uva possuem de 10 a 20% de óleo, que é especialmente rico em ácidos graxos insaturados. Ácidos graxos poliinsaturados, como os ácidos linoléico e linolênico, são essenciais para o corpo humano porque este não é capaz de sintetizá-los. Desta forma, o óleo das sementes e do bagaço de uva, rico em ácido linoléico, pode representar uma fonte valiosa de óleo dietético (GÖKTÜRK BAYDAR *et al.*, 2007).

Segundo dados da indústria, na produção de 100 litros de vinho tinto obtêm-se 25 kg de resíduo sendo 17 kg de bagaço. No Brasil, uma pequena parte deste resíduo é reutilizada para a produção de destilado de uva (conhecida como “grappa”), mas a maior parte é desperdiçada ou subutilizada para adubação do solo e complemento de ração animal (por ser fonte de fibras). Porém, o uso frequente desse resíduo para a adubação de solo é desaconselhável devido à lenta biodegradabilidade das sementes de uva, o que não propicia a conversão total da matéria orgânica de uma safra para a outra. Por outro lado, o bagaço não deve ser oferecido puro aos animais em função da quantidade elevada de fibras; precisa ser triturado e servido com produtos complementares, o que torna inviável seu consumo em grande escala (FAMUYIWA e OUGH, 1990; FREITAS, 2007).

O cacho de uva é composto pelo engaço (parte herbácea) e pelas bagas ou grãos. Na uva madura, o engaço representa de 4 a 10% do peso total, sendo que o peso restante representado pelas bagas. De acordo com o autor, esta variância se deve a forma do desengace, se manual ou automatizada. Na vinificação, o engaço é geralmente separado das bagas antes da fermentação, pois confere ao vinho amargor e adstringência. A baga, por sua vez, é constituída de casca ou película (20 a 40% do peso), sementes (2 a 8%) e polpa (52 a 78%). A casca é revestida externamente por uma substância cerosa protetora, a pruína, que diminui as perdas de água da baga e onde se alojam leveduras e bactérias (LONA, 2003). A casca da uva também é uma fonte de antocianidinas e antocianinas, que são corantes naturais e possuem propriedades antioxidantes, entre elas inibição de lipoperoxidação, e atividade antimutagênica (SOUQUET *et al.*, 2000).

De acordo com Prozil (2008), o engaço da uva é um subproduto gerado no processo de vinificação com potencial valorização. Sua pesquisa teve como principal objetivo a caracterização química do engaço da uva para a utilização deste como matéria-prima para novos materiais. A composição química do engaço revelou que é um material lenho-celulósico, onde o componente majoritário é a celulose (30,3%), seguindo-se as hemiceluloses insolúveis em água quente (21%) e a lenhina (17,4%). Relativamente aos outros componentes, é de destacar a elevada presença de taninos (15,9%) e de extractáveis em água quente (23,7%). Pela análise dos monossacarídeos averiguou-se que as xilanas são o segundo polissacarídeo majoritário no engaço depois da celulose (cerca de 12%).

Ferreira (2010) conclui em seu trabalho que o engaço de uva pode ser utilizado na produção de biocompostos com qualidade superior ao comparado e produzido a partir da madeira do pinheiro. Os provetes de engaço quando comparados com provetes de pinho de densidade média (0,7g/cm³) apresentam melhores propriedades mecânicas como a resistência à flexão e elasticidade e também melhor resistência a umidade. Os biocompostos de engaço de uva são bons isolantes térmicos. O valor da condutividade térmica mantém-se constante à medida que a temperatura aumenta e o seu valor encontra-se dentro dos parâmetros estabelecidos para as madeiras na gama de temperatura de 40 – 180° C.

Segundo Da Silva (2003), engaços são as matérias-primas mais pobres e de valorização mais simples. Os engaços, quando separados por máquina apropriada, constituem cerca de 3,5 – 4,5% da massa total da vindima. Em sua constituição, pode-se considerar que contém um teor aproximado de 50% de umidade, e que na matéria seca

predomina a celulose (30 – 40%) e a lenhina e, em menor quantidade, matéria tartárica. A composição dos engaços torna imprópria a sua utilização como alimento para gado. O seu aproveitamento está limitado, como base de um “composto” ou como matéria-prima para a indústria do papel e de materiais de construção. Pode ser utilizado como adubo orgânico e para a obtenção de combustível devido ao seu elevado teor celulósico. O poder calorífico do engaço é da ordem das 2000 a 2500 calorias/kg, e o seu aproveitamento como combustível é absolutamente viável.

Uma pesquisa da EMBRAPA, em Petrolina, reuniu dados os quais inferem a qualidade forrageira encontrada nas sobras (bagaços) das uvas processadas em indústrias de vinho. É válido ressaltar que, a pesquisa denota esse resíduo como um bom ingrediente para compor dietas alimentares para ovinos e caprinos, em especial durante o período seco quando há escassez de forragem no sertão. Com a expansão do setor vinícola, consideram-se esses dados relevantes para que os agricultores façam bom uso desses resíduos em sua área de trabalho (ARAÚJO, 2007).

A empresa Adubare, sediada em Veranópolis, investe nos resíduos provenientes da viticultura, produzindo adubo orgânico e mineral. Esse adubo é constituído dos elementos químicos básicos (nitrogênio, fósforo e potássio) associado à matéria orgânica (ADUBARE, 2013).

De acordo com Vit (2009), o conceito de sustentabilidade implica no aproveitamento integral e a valorização da totalidade das matérias-primas, o que também vem sendo descrito como um processo de eliminação do que até pouco tempo atrás chamávamos de rejeitos. O processo pretendido se alicerça simultaneamente na geração de alimentos funcionais (Portaria 398 30/04/1999 - Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde), e ao mesmo tempo na norma de orgânicos EU (União Européia). Em seu trabalho, a pesquisadora avaliou a composição centesimal das amostras de farinhas de engaço, bagaço e semente de uva a fim de realizar um comparativo com outras farinhas já disponíveis no mercado. Em suas considerações finais, ela afirma que as farinhas de engaço, bagaço e semente de uva apresentam em termo de fibras e proteínas maior quantidade por amostra que a farinha de trigo comum. A farinha de subprodutos da uva conforme descrita acima apresenta pouca diferença em macro elementos quando comparada com uma farinha integral de trigo.

Por possuírem as características supracitadas, as farinhas de subprodutos de uvas apresentam-se com promissor potencial de aproveitamento, podendo em alguns casos enriquecer o produto final em termos de nutrientes e ainda aumentar o faturamento das

indústrias vinícolas, prevenindo simultaneamente a indesejada formação de chorume (VIT, 2009).

A crescente demanda por alimentos benéficos à saúde é acompanhada pela preocupação por processos que gerem baixo volume de resíduos sólidos, ou que proporcionem seu reaproveitamento. Em sua pesquisa, Klajn (2011), elaborou farinha de bagaço de uva para a formulação de biscoitos, como alternativa de utilização do grande volume deste resíduo gerado pela indústria vitivinícola. A farinha de bagaço de uva foi obtida através da moagem do bagaço seco e, posterior, padronização granulométrica. Já a farinha integral de aveia, foi obtida através da moagem da aveia em flocos. Para a elaboração dos biscoitos foram utilizadas três formulações com diferentes percentuais de substituição da farinha de trigo por farinha de bagaço de uva e farinha integral de aveia, que foram denominadas de formulações A, B e C com 30%, 40% e 50% de substituição, respectivamente. Os biscoitos foram submetidos à análise sensorial e teste de intenção de compra, onde os resultados demonstraram que as amostras não diferiram significativamente ($p < 0,05$) para os atributos crocância e características globais, diferindo apenas quanto ao sabor, onde a formulação A obteve score médio maior, diferindo significativamente da formulação C. Os julgadores demonstraram intenção de compra para todas as formulações, não havendo diferença significativa entre estas ($p < 0,05$). Os biscoitos apresentaram boa aceitação e intenção de compra, demonstrando o potencial do uso do bagaço de uva como ingrediente alternativo na produção de biscoitos, sendo apreciável, não só por suas características sensoriais agradáveis, como também por ser uma alternativa de reaproveitamento de um produto normalmente descartado.

Em recente trabalho, Souza (2013), verificou que o subproduto de vinificação da uva 'Bordô' (*Vitis labrusca*) pode ser utilizado para produzir pigmentos em pó, além de apresentar diversas atividades biológicas. Os pós produzidos no Spray dryer a partir do extrato de cascas e sementes utilizando carreador (maltodextrina 10 DE – equivalência de Dextrose) a 20 e 30%, em temperatura de até 170° C, apresentaram estabilidade no teor de antocianinas e na cor, frente as condições de estocagem (25° C e 32,8% de umidade relativa) superior às amostras de extratos líquidos e à amostra de extrato liofilizado sem carreador. As amostras testadas apresentaram capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana principalmente contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Apresentaram também altos valores

de inibição da enzima arginase de *Leishmania*, indicando o potencial dessa variedade de uva como fonte de compostos a serem utilizados como ingrediente funcional.

2.12 Antibacterianos naturais

Cresce cada vez mais no mercado consumidor de alimentos a ideia de que produtos naturais são fonte de saúde e bem-estar, em oposição aos produtos sintéticos, frequentemente relacionados com efeitos colaterais indesejados. Dentro dessa perspectiva, produtos “verdes” tornam-se cada vez mais valorizados na sociedade, e essa demanda tem causado mudanças significativas em diversos setores industriais, inclusive no setor de bebidas e alimentos. Buscam-se, por parte das empresas do setor, elementos naturais que sirvam de matéria-prima para o desenvolvimento de uma grande variedade de produtos. O potencial antimicrobiano de resíduos agroindustriais já vem sendo pesquisado nos últimos anos. Foi demonstrada a atividade antimicrobiana em sementes de uva (JAYAPRAKASHA *et al.*, 2003; BAYDAR *et al.*, 2004), bagaços de uva (PUUPPONEN-PIMIA *et al.*, 2001; KATALINIC *et al.*, 2010), partes de uvas e produtos da vinificação (ANASTASIADI *et al.*, 2008).

À medida que a economia global gera produção e transporte de alimentos em escala mundial, o uso de antimicrobianos em alimentos se faz cada vez mais necessário, para que se garanta fornecimento de alimentos de qualidade. Na indústria de alimentos, o uso de conservantes naturais tem se tornado frequente, sendo que muitas especiarias e ervas representam alternativas em potencial no combate à deterioração e ao crescimento de microrganismos patogênicos desde que apresentem, propriedades antimicrobianas (MARTIN, 2011).

As plantas apresentam diversas vias metabólicas secundárias que levam à formação de compostos, cuja distribuição é restrita a algumas famílias, gêneros ou mesmo espécies. Diversos estudos têm sido realizados com óleos essenciais das mais diversas plantas, e sua atividade antimicrobiana frente a microrganismos patógenos e deterioradores, tem sido comprovada (SALIMENA *et al.*, 2010).

Diversos trabalhos realizados sobre a ação antibacteriana de plantas medicinais têm comprovado sua eficácia e desta forma ampliado sua utilização. De acordo com Wiest *et al.* (2009a), a pesquisa de fatores de proteção antibacteriana em recursos naturais como plantas com indicativo medicinal ou condimentar vem sendo recomendado como prioridade pelas Conferências Mundiais de Saúde. Em suas

revisões, os autores descrevem a triagem *in vitro*, através de testes de diluição em sistema de tubos múltiplos, de atividade anti-estafilococo de diferentes extratos de 80 plantas com indicativo etnográfico medicinal, condimentar ou aromático, acessadas na região metropolitana de Porto Alegre, RS. Demonstrou-se atividade seletiva em 39 espécies, enquanto as demais 41 não apresentaram atividade.

Os mesmos autores estenderam suas observações à prospecção de atividade em plantas frente a *Salmonella* Enteritidis (WIEST *et al.*, 2009b), demonstrando algum tipo de atividade em 50 espécies dentre 86 testadas. Diferentes extratos de 59 plantas com indicativo medicinal, foram confrontadas frente a *Escherichia coli*, observando-se atividade antibacteriana seletiva em 30 delas (WIEST *et al.*, 2009c).

Majolo (2009) determinou a intensidade de atividade de inibição bacteriana e intensidade da atividade de inativação bacteriana em soluções contendo extratos hidroetanólicos e hídricos (decocto e infuso) de *Bixa orellana* L. (urucum) sobre inóculos padronizados de *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes*. Os extratos hídricos apresentaram baixa atividade de inibição e/ou inativação sobre os inóculos bacterianos, enquanto que a forma de extração hidroetanólica apresentou atividade antibacteriana seletiva e significativamente mais intensa (inibição/inativação) entre as cinco bactérias testadas. Independente da forma de extração, as bactérias *Enterococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes* foram as mais sensíveis à atividade antibacteriana, enquanto que *Escherichia coli* apresentou a menor sensibilidade.

Segundo Maciel (2011), o extrato aquoso e o etanólico do hibisco são utilizados em sistemas alimentares para prevenir a contaminação bacteriana. Em seus estudos recentes, constata uma possível relação direta entre a concentração de antocianina e a atividade antibacteriana em diferentes estruturas vegetais do hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.).

2.13 Atividade antibacteriana em subprodutos da uva

O potencial antimicrobiano de resíduos agroindustriais já vem sendo pesquisado nos últimos anos. Foi demonstrada a atividade antimicrobiana em sementes de uva, bagaços de uva (MARTIN, 2011), partes de uvas e produtos da vinificação (ANASTASIADI *et al.*, 2008). Chan (2002) verificou atividade antimicrobiana do resveratrol contra microrganismos causadores de doenças de pele, notadamente as

bactérias *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* e os fungos *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum gypseum*.

Rotava *et al.* (2009), determinaram *in vitro* a atividade antibacteriana, antioxidante e tanante de subprodutos da uva (*Vitis vinifera*) para seu aproveitamento como ingredientes alternativos na indústria avícola e na conservação de alimentos. O extrato de semente de uva desengordurada apresentou alta atividade antibacteriana *in vitro* contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, embora baixa atividade contra cepas de *Salmonella* sp.

Mardigan *et al.* (2009b) em seus estudos preliminares com extrato etanólico do bagaço de uva Isabel (*Vitis labrusca*), testou seu potencial de inibição frente à bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ao qual tem um papel importante na área de alimentos, por estar relacionada com o manipulador de alimentos e também causar intoxicação alimentar. A atividade antibacteriana deste extrato determinou o desenvolvimento de halos de inibição de 7,75 a 12,5mm de diâmetro para a bactéria *Staphylococcus aureus*. Estes resultados indicam que o extrato de bagaço de uva Isabel possui potencial como antibacteriano em alimentos.

A uva Isabel é uma das principais cultivares de *Vitis labrusca*. Sendo destaque como uva de mesa comum, variedade rústica e, portanto, menos exigente em tratamentos fitossanitários. Foi determinado o conteúdo total de compostos fenólicos em extrato de uva Isabel (*Vitis labrusca*) pelo método de Folin-Ciocalteu em análise espectrofotométrica e a atividade antibacteriana avaliada *in vitro* do extrato de uva sobre Bactérias Ácido-Láticas (BAL), causadoras de limosidade em salsichas. O resultado médio do teor de fenólicos totais no extrato de uva Isabel foi de 14,80 mg/mL. As salsichas foram banhadas em extrato de uva, embaladas a vácuo e armazenadas em geladeira, com temperatura de 8°C. Determinou-se o teor de BAL nas salsichas com e sem tratamento com extrato de uva nos dias 0, 15, 30 e 45. Constatou-se que houve diferença significativa, onde os resultados para análise sem extrato de uva foram 2,74; 4,38; 5,18 e 6,78 log UFC/mL. Nas amostras com tratamento de extrato de uva foram 1,70; 4,09; 3,37 e 4,48 log UFC/mL. A concentração dos compostos fenólicos do extrato de uva pode ser influenciada pelo tipo de extração e procedimentos empregados na produção do extrato de uva e pelas reações que ocorrem durante o seu armazenamento (MARDIGAN *et al.*, 2009a).

Segundo os resultados demonstrados por Martin (2011), a atividade inibitória de extratos de partes de uva, como bagaço e sementes, sobre bactérias Gram-positivas está em concordância com os resultados encontrados em estudos anteriores (JAYAPRAKASHA *et al.*, 2003; BAYDAR *et al.*, 2004). Atividade antibacteriana de uvas e subprodutos de vinificação, tais como bagaço, sementes e engaços, contra a bactéria *Listéria sp.*, reforçam o potencial de extração de compostos antimicrobianos nesse tipo de resíduo (ANASTASIADI *et al.*, 2008).

2.14 - As bases da viticultura orgânica

A viticultura ecológica, base de uma enotecnia ecológica, tem proporcionando grandes extensões de seu cultivo e a diversidade de produtos que gera. Segundo Hidalgo (2002), dentro de um amplo contexto da agricultura ecológica ou biológica, mundialmente, grande interesse tem despertado como respostas aos grandes problemas surgidos nos últimos tempos, pelo abuso indiscriminado de determinados produtos de sínteses empregados na produção, elaboração e conservação dos alimentos.

Em regiões tropicais, a ocorrência de doenças pode limitar a viticultura, caso medidas adequadas de controle não sejam adotadas. Os conhecimentos sobre os patógenos importantes para as diferentes cultivares de videira, os estágios de maior suscetibilidade da planta às principais doenças, a influência das condições climáticas sobre os patógenos e as plantas e os fungicidas empregados em cada situação, auxiliam no estabelecimento de um programa de controle racional de doenças, tornando os tratamentos mais eficientes e reduzindo os custos de produção e os riscos de contaminação do ambiente (NAVES *et al.*, 2006; LULU, 2008).

A viticultura orgânica se baseia em adubação orgânica, cobertura de solo com vegetação e controle de moléstias exclusivamente com calda bordalesa¹. Nas condições brasileiras pode ser praticada apenas em situação de consumo doméstico de uvas de espécies americanas, tolerantes às moléstias. A agricultura orgânica abrange todos os sistemas agrícolas que promovam a produção de alimentos e fibras de modo sadio

¹ Calda bordalesa é permitida na agricultura orgânica porque os seus componentes, sulfato de cobre e cal, são pouco tóxicos, além de contribuir para o equilíbrio nutricional das plantas, fornecendo cálcio e cobre. Existem formulações prontas do produto no comércio, porém, pela facilidade de preparo, eficiência e economia, compensa a sua preparação caseira. Para 10 litros de calda bordalesa a 1%: 100 gramas de sulfato de cobre, 100 gramas de cal virgem e 10 litros de água. Observação: se for cal hidratada, utilizar 180 gramas. (MOTTA, 2008).

socialmente, economicamente e do ponto de vista ambiental. Tais sistemas tem como base da capacidade produtiva a fertilidade intrínseca do solo, o respeito à natureza, às plantas, aos animais e à paisagem, otimizando todos estes fatores interdependentes (GIOVANNINI, 2001).

A calda bordalesa foi utilizada, pela primeira vez, por volta de 1882, em Bourdeaux, na França, para controlar o míldio em videira. É um insumo utilizado em hortas e pomares orgânicos, devido a sua eficiência, principalmente em controlar várias doenças causadas por fungos (míldio, ferrugem, requeima, pinta preta, cercosporiose, antracnose, manchas foliares, podridões, entre outras) em diversas culturas. Tem também efeito repelente contra alguns insetos, tais como: cigarrinha verde, cochonilhas, trips e pulgões (MOTTA, 2008).

A agricultura biológica ou orgânica reduz drasticamente o emprego de insumos externos através da exclusão de fertilizantes químicos, pesticidas e medicamentos químicos sintéticos. Ao contrário, utiliza a força das leis naturais para aumentar os rendimentos e a resistência às moléstias (GIOVANNINI, 2001).

O vinhedo orgânico é visto como um sistema integrado de conversão de energia do sol em nutrientes do solo e da água nas uvas, com um produto final que reflete o "terroir" local: as condições ambientais (hidrologia, solo e microclima), bem como as práticas tradicionais de processamento. Para manejar um vinhedo ecológico é necessário alta tecnologia, principalmente no que se refere ao aspecto fitossanitário. Se deve antes de tudo adaptar formas de condução, utilizando plantas sãs e resistentes, pois a condição ecológica está amplamente inclusa na genética (GIOVANNINI, 2001; HIDALGO, 2002).

Todos os aspectos da viticultura como a forma dos topos dos arbustos, o solo, ou controle de pragas e doenças são gerenciados para otimizar a qualidade e a saúde das uvas e do vinho, produzidos ecologicamente. Eles são a base da vinificação ecológica (TRIOLI e HOFMANN, 2009).

2.15 Regulamentação – viticultura orgânica europeia e brasileira

Várias organizações europeias têm criado uma carta comum para lançar regulamentos para a vinificação orgânica: AIAB, Féderbio, FIRAB (Itália), e ITAB FNIVAB (França), SEAE (Espanha), e Bio Suisse e Demeter Switzerland.

O documento, denominado “Carta Orgânica Vinificação Europeia” (EOWC) visa promover o desenvolvimento de vinhos orgânicos certificados e, portanto, compensar a falta de um regulamento da União Europeia sobre o vinho orgânico. O conteúdo da carta é baseado nas mais recentes propostas da Comissão Europeia sobre vinho orgânico, emitido em janeiro de 2010. Há várias razões para a implementação desta Carta: superar a falta de uma legislação europeia, mostrar a necessidade de uma regulamentação europeia comum para o vinho orgânico, e para organização entre compradores e consumidores a fim de garantir a transparência sobre os métodos da vinificação. Produtores de vinhos orgânicos também são incentivados a divulgar a iniciativa e participar ativamente no reconhecimento de uma carta de vinhos europeus orgânicos, que atesta a sua vinificação de acordo com uma carta privada, de acordo com o EOWC, e para indicar a sua participação no rótulo do produto (EOWC, 2012).

No Brasil, as primeiras associações e instituições de agricultores que buscavam cultivar sem agrotóxicos foram fundadas nos anos 80, mas só em 1999 a Instrução Normativa 7 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabeleceu as principais diretrizes para a produção de orgânicos no país. A Lei dos Orgânicos (Lei 10.831/03), conceitua o sistema orgânico de produção agropecuária, estipulando suas finalidades, componentes e obrigações; Decreto nº 6.323/07 – regulamenta a Lei nº 10.831/03, os procedimentos para conversão do sistema convencional para o orgânico, regras para comercialização, cria o Sistema Brasileiro de Avaliação da Conformidade Orgânica – SisOrg, determina o cadastramento de produtores da venda direta, atribuições de fiscalização, infrações e penalidades; Instrução Normativa nº 19/09 – institui os mecanismos de controle e informação da qualidade orgânica, institui os escopos de certificação, procedimentos de credenciamento de OAC, de certificação e cadastramento de produtores, e determina exigências de rotulagem; Instrução Normativa nº 50/09 – institui o selo oficial do SisOrg e estabelece os requisitos para sua utilização (COAGRE, 2012).

A produção, processamento, a rotulagem e comercialização dos produtos orgânicos no Brasil são regidas pela Lei 10.831/03, e seus anexos. A Vinícola Mena Kaho (empresa localizada em Bento Gonçalves – RS, que cedeu grande parte dos resíduos, provenientes de cultivo orgânico, para a realização do experimento) recebe certificação auditada, realizada por certificadora acreditada pelo INMETRO e credenciada junto ao Ministério da Agricultura, que faz o controle do setor. As certificadoras, tais como a ECOCERT BRASIL, são responsáveis pela emissão dos

certificados que garantem a qualidade orgânica dos produtos, válidos para mercado nacional e mercados internacionais com os quais o Brasil possui acordos de equivalência (ECOCERT, 2011; 2013).

2.16 Agricultor como sujeito em agroecologia

A agricultura familiar, que sempre buscou com legitimidade sua manutenção no campo através das lutas sociais no embate ao agronegócio, pode sustentar um novo paradigma baseado na busca de qualidade de vida através da geração de renda, segurança alimentar garantida na própria propriedade; produção de alimentos saudáveis, limpos e acessíveis para a população, atendendo o mercado interno; equilíbrio com os ecossistemas e produção sustentável e ecológica locais (MAZZALA NETO, 2009).

A noção de sustentabilidade foi pela primeira vez introduzida numa discussão de caráter ambiental, em 1983, realizada em Nairóbi e organizada pela Organização das Nações Unidas (ONU) para estudar a relação entre desenvolvimento e meio ambiente e criar uma nova perspectiva para abordar estas questões. A Comissão sobre Meio Ambiente e o Desenvolvimento (UNCED) produziu nesse evento um documento chamado de Nosso Futuro Comum ou Relatório Brundtland, em referência à presidente da Comissão, a então primeira-ministra da Noruega, Gro Harlem Brundtland. Esse relatório veio a público em 1987 e definiu o desenvolvimento sustentável como um "novo caminho de progresso social, ambiental e econômico que procura atender as aspirações do presente sem comprometer a possibilidade de atendê-las no futuro" (AZEVEDO e PELICIONI, 2011).

No Brasil, o processo de modernização da agricultura inicia no final da década de 50, com a mecanização agrícola. As políticas de modernização seguiram a mesma lógica dos países industrializados. Nem de longe havia preocupação com a sustentabilidade do processo. A concepção de desenvolvimento como sinônimo de crescimento econômico, ao longo do tempo, dá sinais de insustentabilidade e traz consequências sérias do ponto de vista econômico, social e ambiental (MENEGETTI, 2009).

A agricultura biológica tem de ser sustentável e nesse sentido, reduz a utilização de fatores de produção externos à exploração, reduz o consumo de energia, mantém e melhora a fertilidade do solo com base nos recursos da exploração (resíduos orgânicos, leguminosas em simbiose como a bactéria rizóbio fixadora de azoto, árvores de fruto e outras espécies vegetais em simbiose com micorrizas – fungos) para aumentar a absorção de fósforo e de outros nutrientes em solos pobres (FERREIRA *et al.*, 2008).

Pesquisas realizadas com recursos naturais, integrando os conhecimentos de fitoquímica, farmacognosia, pesquisa de sistemas antimicrobianos entre outros, com os objetivos e as técnicas preconizadas pela agroecologia, envolvem uma complexidade de atuação, que não permite restrição do conhecimento somente dentro de uma ciência, muito menos excluindo a integração e a participação plena do agricultor como sujeito da produção, da aplicação e do usufruto do conhecimento produzido (GIROLOMETTO, 2005).

Contemporaneamente, nos debates sobre desenvolvimento rural sustentável tornou-se usual recorrer ao termo agroecologia para qualificar uma determinada proposta. Contudo, a utilização dessa noção não especifica, de fato, o que está sendo defendido, uma vez que existe uma grande diversidade de significados e concepções, por vezes divergentes, envolvidas neste termo. A noção de agroecologia é reivindicada em, especialmente, dois momentos: para designar um tipo de conhecimento agrônomico e como projeto político de determinados movimentos sociais (DE CAMARGO, 2009).

A ciência agroecológica apresenta duas características que a distinguem da abordagem agrônomico convencional: a visão ecológica no estudo dos sistemas agrícolas, ou seja, um enfoque sobre as relações ecológicas no campo, sua dinâmica e função; e a perspectiva social, pois acredita-se que os graus de resiliência e estabilidade dos agroecossistemas não são determinados exclusivamente por fatores ambientais ou bióticos, mas também por fatores socioeconômicos (HECHT, 2002).

Acredita-se que o atual modelo de desenvolvimento rural e de agricultura convencional é insustentável no tempo, dado sua grande dependência de recursos não renováveis e limitados. Além disso, esse modelo tem sido responsável pelo aumento das diferenças socioeconômicas no meio rural. As estratégias de desenvolvimento convencionais revelaram-se fundamentalmente limitadas em sua capacidade de promover um desenvolvimento equânime e sustentável (ALTIERI, 2004).

Diante dos pontos supracitados, contempla-se a necessidade prioritária em se aplicar a agroecologia como resposta as consequências da crise ecológica resultante da artificialização e simplificação da agricultura e seus processos, oriundos da introdução da lógica da produção industrial na agricultura (IAMAMOTO, 2005). Nesse contexto, a agroecologia aborda de maneira nova, a integração entre os princípios agrônômicos, ecológicos e socioeconômicos, assim como também a compreensão e avaliação do efeito das tecnologias sobre os sistemas agrícolas e a sociedade como um todo (ALTIERI, 2004).

2.17 As zoonoses em saúde e produção animal e em alimentos derivados

Entende-se por zoonoses, as doenças naturalmente transmissíveis entre os animais e o homem e vice-versa, podendo classificar-se como: zoonoses diretas, nas quais uma única espécie de hospedeiros/ susceptíveis é suficiente para manter o ciclo da doença, no exemplo das salmoneloses em geral; metazoonoses como aquelas em que são necessários um vertebrado e um vetor invertebrado, no exemplo da fasciolose; ciclozoonoses como aquelas em que são necessários dois vertebrados de espécies diferentes para a manutenção do ciclo, no exemplo das teníases/ cisticercose; saprozoonoses como aquelas doenças com uma fase do ciclo que pode ocorrer em local inanimado como água, no exemplo da leptospirose (ACHA e SZYFRES, 2003).

Na epidemiologia e profilaxia de doenças transmissíveis, a pesquisa de fatores de proteção sustentáveis, mormente entre recursos naturais renováveis como plantas com indicativo medicinal, condimentar ou aromático, constitui prioridade segundo a orientação da Organização Mundial da Saúde/Conferências Mundiais de Saúde (AKERELE, 1988; 1993), com ênfase aos aspectos culturais tradicionais envolvidos e sua relação com a atenção básica.

O gênero *Salmonella* tem sua importância para a saúde coletiva, considerando sua resistência no meio externo, mais especificamente em resíduos, dejetos, alimentos para consumo humano e animal, solo e águas de abastecimento, manifestando-se tanto individualmente como em centenas ou milhares de indivíduos através de surtos. Sua verdadeira incidência é difícil de ser avaliada, considerando as deficiências da vigilância epidemiológica e de sua relação com a notificação, o que não impede o aumento significativo do número de focos constatados (ACHA e SZYFRES, 2003). Nesse

sentido, em saúde e produção animal, com conseqüente repercussão na cadeia alimentar, Castagna *et al.* (2004) demonstraram a presença de *Salmonella* sp. no trato intestinal e em tonsilas/linfonodos submandibulares de suínos, em 79% das amostras utilizadas no preparo de embutidos, constituindo importante fator de risco para a contaminação de carcaças utilizadas na fabricação desses produtos.

A *Escherichia coli* encontra-se largamente difundida na natureza, tendo como habitat principal o trato intestinal de animais de sangue quente, integrando as bactérias do grupo coliforme, subdividindo-se em vários biótipos e sorotipos, alguns dos quais patogênicos em potencial para o homem, constituindo-se os alimentos e a água sua principal fonte de infecção. A bactéria é referenciada ainda hoje como indicador de contaminação fecal, mormente em alimentos, pela facilidade de sua comprovação diagnóstica e por sua representatividade. Os diferentes sorotipos (enterohemorrágico, enterotoxígeno, enteroinvasor, enteropatógeno e enteroagregativo) de *Escherichia coli* vêm merecendo crescente atenção epidemiológica, considerando os riscos para os humanos expostos à esta zoonose considerada emergente (ACHA e SZYFRES, 2003).

A importância do gênero *Staphylococcus* em saúde coletiva permanece em evidência, considerando que o portador humano constitui a sua principal fonte de infecção, estimando-se que 30 a 35 % das pessoas sadias albergam esta bactéria na nasofaringe ou na pele. Por sua vez, até 100% de suínos e aves podem albergar este agente zoonótico em sua pele ou trato respiratório superior. Sob o olhar epidemiológico, seu envolvimento na mastite bovina sub-clínica constitui outra preocupação constante, podendo os animais produtores de carne e de leite contribuir significativamente na contaminação das diferentes cadeias alimentares (ACHA e SZYFRES, 2003). Os estafilococos existem no ar, na poeira, no esgoto, na água, no leite e nos alimentos ou nos equipamentos de processamento de alimentos, nas superfícies expostas aos ambientes, nos seres humanos e nos animais, sendo estes dois últimos os principais reservatórios do agente (FORSYTHE, 2002).

O gênero *Enterococcus* é uma importante causa global de infecções hospitalares, sendo cada vez mais associados com infecções do trato urinário, endocardite, infecções intra-abdominais e pélvicas, infecções relacionadas ao cateter, infecções de feridas cirúrgicas e infecções do sistema nervoso. As duas espécies mais comuns dos *Enterococcus* são *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. Ambos são capazes de produzir os biofilmes, que consistem de uma população de células ligadas de forma irreversível em várias superfícies bióticas e abióticas (MOHAMED e HUANG, 2007).

De acordo com Paradella *et al.* (2007), *Enterococcus faecalis*, está presente em infecções endodônticas e periapicais persistentes. Características microbiológicas, bem como seus fatores de virulência, determinam a patogenicidade desta espécie, o que se traduz em condições clínicas pouco favoráveis e persistência das infecções, mesmo quando um novo tratamento é instituído.

2.18 Desinfetantes e antissépticos

De acordo com a Farmacopéia (Brasil, 2010), desinfetantes são produtos destinados a destruir, indiscriminada ou seletivamente, microrganismos, quando aplicados em objetos inanimados ou ambientes.

Os antissépticos são formulações com função de eliminar ou inibir o crescimento de microrganismos quando aplicados sobre a pele ou mucosas. Estes podem ser classificados como agentes bactericidas devido à capacidade de destruir as bactérias nas formas vegetativas, e como agentes bacteriostáticos quando inibem o crescimento do microrganismo sem destruí-lo. Uma característica importante a ser acrescida aos antissépticos é a atividade residual, ou seja, atividade química persistente sobre a pele. Já os desinfetantes com largo espectro de atividade antimicrobiana podem ser utilizados em vários locais, incluindo a indústria de processamento de alimentos, bebidas, farmacêutica e médico-hospitalar. Seu uso na área hospitalar e em outros serviços de saúde tem grande importância devido às suas propriedades bactericidas, virucidas e fungicidas que causam a inativação de microrganismos na forma vegetativa (não esporulada) em superfícies inanimadas (REIS *et al.*, 2011).

CAPÍTULO II

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

Engaços, cascas e folhas foram coletados nos meses de fevereiro e março, durante a safra de 2011, em dois momentos diferenciados. Após o desengace da uva na vinícola, obteve-se o engaço (ramificações do cacho **Fig. 03**, em apêndice). O bagaço (**Fig 04**, em apêndice), obteve-se após a prensagem sem a fermentação, para suco. Em seguida, a casca e as sementes foram separadas manualmente. As folhas foram coletadas após a colheita da uva, nas parreiras. Os locais de coleta foram Campo Experimental da Embrapa Uva e Vinho, localizado em Bento Gonçalves, onde foram coletados cachos de uva do cultivar ‘Niágara Rosada’, para Controle de resíduos fitossanitários; propriedade da família Strapazzon localizada na Linha São Pedro, em Bento Gonçalves (resíduos do cultivar ‘Moscato’) e Vinícola Mena Kaho, Sucos e Vinhos Finos Orgânicos Certificados, localizada na Linha Eulália, em Bento Gonçalves (resíduos dos cultivares ‘Bordô’ e ‘Isabel’).

As extrações de álcool das alcoolaturas e hidroalcoolaturas; assim como as análises para determinação de polifenóis e antocianinas foram realizadas no Laboratório de Higiene do Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em Porto Alegre, RS. As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, *Campus* Bento Gonçalves.

3.2 Seleção e preparo das amostras

Amostras intencionais, selecionadas folhas e resíduos de uvas cultivadas de forma orgânica, com o objetivo de evitar resultados falsos (negativos ou positivos). A atividade antibacteriana encontrada se deve aos princípios ativos presentes nos extratos de folhas, engaços e cascas, sem uma possível interferência de resíduos de agrotóxicos utilizados nas videiras.

O cultivar ‘Niágara Rosada’ safra 2011 e safra 2012, gentilmente doado pela Embrapa Uva e Vinho, produzida com cobertura plástica, não recebeu calda bordalesa e, por este motivo, foi selecionado como controle experimental.

O material coletado foi acondicionado em sacos plásticos e levados em seguida ao laboratório, onde foram lavados com água corrente e deixados para secar na mesa, em temperatura ambiente. Após estarem secas, as amostras foram picadas com tesoura de poda (engaço), tesoura comum (folhas) e as cascas foram separadas, retirando as sementes de forma manual. Todas as amostras foram pesadas antes de serem armazenadas em vidro. Para o preparo de alcoolaturas, utilizou-se vidros esterilizados com tampa, na seguinte proporção: 400 gramas da amostra *in natura* em 1 litro de álcool etílico de cereal à 96° GL (Farmaquímica, Porto Alegre/RS/BR), de acordo com a Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 1959).

Para o preparo de hidroalcoolaturas utilizou-se amostras secas em estufa à 40° C com ventilação forçada, até pesagem constante. As amostras foram picadas e colocadas em vidros esterilizados com tampa, na seguinte proporção: 100 gramas da amostra seca em 1 litro de álcool etílico de cereal à 70° GL (Farmaquímica, Porto Alegre/RS/BR), de acordo com a Farmacopéia (BRASIL, 1959).

Amostras de folhas, engaços e cascas dos cultivares de uvas tinta (‘Isabel’ e ‘Bordô’), branca (‘Moscató’) e rosada (‘Niágara’), a serem utilizados como decocto, procedeu-se como anteriormente, secando o material em estufa à 40° C com ventilação forçada, até pesagem constante. Estas amostras foram armazenadas em envelope de papel pardo até o momento da decocção, para serem analisadas.

3.3 Seleção e preparo dos inóculos

As amostras de inóculos padrões *American Type Culture Colletion* (ATCC) foram selecionadas pela sua importância em saúde pública, produção animal e alimentos derivados; todas provenientes da coleção bacterioteca mantidas sob refrigeração, no Laboratório de Higiene de Alimentos do Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos (ICTA), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Dois bactérias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), e duas bactérias Gram negativas: *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), *Escherichia coli* (ATCC 11229), foram utilizadas para a

avaliação da atividade antibacteriana dos decoctos e dos extratos de folhas e resíduos da vitivinicultura.

Os inóculos bacterianos foram reativados em meio de cultura Brain Heart Infusion Oxoid® (BHI), em câmara de fluxo laminar, na proporção recomendada pelo fabricante (37 g/L), distribuído na quantidade de 5 mL/tubo de ensaio. Em seguida foram transferidos para estufa bacteriológica, para incubação aeróbia a 37°C por um período de 18 a 24 horas, com o objetivo de atingir uma concentração $\geq 1,0 \times 10^8$ UFC/mL.

Foram realizadas diluições seriais logarítmicas seguindo a Técnica de Diluição Serial de Tubos Múltiplos (Avancini, 2002), a partir do inóculo inicial, transferindo-se assepticamente, 1ml deste para tubos de ensaio contendo 9 ml de água peptonada estéril a 0,1% para obter a diluição 10^{-1} , e assim sucessivamente até a diluição 10^{-8} .

Nas diluições 10^{-7} e 10^{-8} realizou-se a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)/ mL, através da Técnica de Plaqueamento em Profundidade (Pour Plate), conforme descrito na Farmacopéia Brasileira (BRASIL,1988). A análise foi feita em triplicata, adicionando-se 1 mL da diluição em cada placa de Petri vazia, previamente esterilizada. Verteu-se 20 mL (aproximadamente) de meio de cultura, neste caso, ágar nutriente (Nutrient Agar, ACUMEDIA®, Maryland/Baltimore/USA) fundido e resfriado a temperatura 40°C a 45°C. Agitou-se a placa em movimentos circulares. Após solidificação do meio, as placas foram colocadas em estufa bacteriológica, em posição invertida. A leitura e contagem foi realizada após 24 horas de incubação aeróbia a 37°C. Fez-se a média aritmética das Unidades Formadoras de Colônias. O teste de triagem só era realizado após a certificação de haver crescimento nas placas, na diluição $10^{-7} > 10$ UFC/mL, e na diluição $10^{-8} \geq 1$ UFC/mL, segundo Cavalli-Sforza (1974).

3.4 Método para obtenção dos extratos

Após um período mínimo de quinze dias, as alcooleturas e hidroalcooleturas armazenadas em vidro, foram filtradas com papel de filtro esterilizado, o volume obtido após filtragem foi anotado, assim como o teor alcoólico e a temperatura. Com o auxílio da tabela “Força Real dos Líquidos Espirituosos” (**Quadro 2**, em anexo), fez-se a devida correção da graduação alcóolica. A quantidade do álcool a ser retirado foi calculada segundo Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 1959), com base na equação que

consta nos protocolos modelo em anexo. Após a realização dos cálculos e os protocolos preenchidos, as amostras eram submetidas à destilação fracionada sob pressão reduzida em aparelho evaporador rotatório.

A porção alcoólica foi desprezada e o extrato obtido foi vertido em vidro estéril para ser transportado ao laboratório de microbiologia do IFRS *Campus* BG para realizar as análises de atividade antibacteriana. O volume inicial não foi reconstituído, porque posteriormente, foram realizadas diluições progressivas para obter extratos a 50%, 40%, 30% e 20% a partir do extrato puro destilado. Esta modificação foi acatada pelo grupo de pesquisa atual, o que facilitou o transporte até o laboratório situado na cidade de Bento Gonçalves, reduzindo também a possibilidade de contaminação.

A concentração 50% foi obtida a partir de 50 mL do extrato puro destilado com a adição de 50 mL de água destilada esterilizada, no momento das análises. A concentração 40% foi obtida a partir de 40 mL do extrato puro destilado com a adição de 60 mL de água destilada esterilizada. A concentração 30% foi obtida a partir de 30 mL do extrato puro destilado com a adição de 70 mL de água destilada esterilizada. E, para finalizar, a concentração 20% foi obtida a partir de 20 mL do extrato puro destilado com a adição de 80 mL de água destilada esterilizada.

Para o controle da assepsia dos procedimentos de extração, determinou-se a esterilidade dos extratos em câmara de fluxo laminar, retirando-se alíquotas de 5 mL, semeadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de Brain Heart Infusion Oxoid® (BHI), na proporção recomendada pelo fabricante (37 g/L). Os tubos eram transferidos para incubação aeróbia em estufa bacteriológica, a 37°C por um período de 24 e 48 horas. Foram realizados os respectivos plaqueamentos em ágar nutriente (Nutrient Agar, ACUMEDIA®, Maryland/Baltimore/USA). Após 24 horas de incubação das placas, eram realizadas as leituras para confirmação da esterilidade. Estes testes foram realizados concomitantemente às análises de atividade antibacteriana.

3.5 Método para obtenção do decocto

Folhas, engãos e cascas dos quatro cultivares foram submetidos ao processo de decocção (planta seca) para obter as soluções antissépticas e/ou desinfetantes testadas, segundo Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 1959). Utilizou-se a proporção 100 gramas de amostra seca para 1 litro de água destilada. Após a fervura, a amostra contida no

frasco Erlenmayer com uma tampa de vidro (placa de Petri), permaneceu sob fogo brando (bico de Bunsen e manta de amianto) por 15 minutos. Após este tempo, o decocto foi resfriado em temperatura ambiente e coado com papel de filtro esterilizado. O volume evaporado não foi repostado, padronizando o procedimento conforme os extratos obtidos. A análise foi realizada logo em seguida, denominando-o de concentração 100%. Verificou-se a esterilidade do decocto, realizando teste com um tubo controle contendo 5 mL da amostra em 5 mL de Brain Heart Infusion Oxoid® (BHI), na proporção recomendada pelo fabricante (37 g/L), incubado à 37°C em estufa bacteriológica, por um período de 24 e 48 horas. Após estes períodos foi realizado plaqueamento em ágar nutriente (Nutrient Agar, ACUMEDIA®, Maryland/Baltimore/USA) para confirmação da esterilidade.

3.6 Método de avaliação da atividade antibacteriana

De acordo com Alves *et al.* (2008), os dois métodos mais comumente utilizados para o screening de extratos de plantas com potencial antibacteriano são o de difusão em ágar e de diluição em caldo. O método de difusão em ágar pode ser realizado através das técnicas do disco, do poço ou template. Quando se utiliza o método de difusão, vários fatores podem se tornar fontes de erros, sendo os principais: a espessura do meio de cultura, uso de swab com excesso de caldo para inoculação das placas, interações entre o antimicrobiano e o meio de cultura e erro na medida das zonas de inibição. Em sua pesquisa, o método de diluição em caldo foi a melhor opção para se determinar a atividade antimicrobiana.

Os extratos dos resíduos de viticultura, em cultivo orgânico, foram testados em diluições consecutivas, e a menor concentração capaz de inibir o crescimento do inóculo selecionado é considerada como a Concentração Inibitória Mínima (CIM); as concentrações bactericidas mínimas (CBM) como a menor concentração capaz de inativar o inóculo. Segundo Andrews (2001), as CIM's são consideradas excelentes ferramentas para determinar a atividade *in vitro* de novos antimicrobianos.

A verificação da atividade antibacteriana dos diferentes extratos: folha, casca e engaço de uva, e respectivos decoctos, provenientes dos seguintes métodos de extração alcoolatura, hidroalcoholatura e decocção; foi determinada através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM), utilizando a

Técnica de Diluição Serial com Sistema de Tubos Múltiplos, segundo Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft/ Sociedade Alemã de Medicina Veterinária (1981), com base nas modificações sugeridas por Avancini (2002), confrontando-se os extratos com 8 diluições seriais logarítmicas (10^{-1} a 10^{-8} UFC/mL) dos diferentes inóculos bacterianos.

Os meios de cultura utilizados para realizar a triagem foram: Brain Heart Infusion Oxoid® (BHI), preparado em dupla concentração (74 g/L), e ágar nutriente (Nutrient Agar, ACUMEDIA®, Maryland/Baltimore/USA), preparado conforme indicação do fabricante, vertido em placas de Petri previamente esterilizadas por autoclave, e deixados em cima da bancada microbiológica, a temperatura ambiente para solidificar.

Organizou-se duas linhas de tubos de ensaio, cada qual composta por nove tubos contendo 4,5 mL do meio BHI em dupla concentração. Uma das linhas além do BHI em dupla concentração, no momento de preparar o meio, recebeu também os seguintes produtos denominados desinibidores ou desestressores: Polisorbato/Tween 80 (REAÇÃO QUÍMICA®, Porto Alegre/RS/BR) a 6%, L-histidina (LABSYBTH®, Diadema, SP/BR) a 0,2% e Lecitina de soja (HERBARIUM®, Colombo, PR/BR) a 0,6%.

Em câmara de fluxo laminar, cada tubo de ensaio de ambas as linhas, recebeu assepticamente, 4,5 mL da amostra a ser testada (extrato etanólico, extrato hidroetanólico ou decocto) nas diferentes concentrações propostas para encontrar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM).

Alíquotas de 1 mL das devidas diluições do inóculo bacteriano (de 10^{-1} UFC/mL a 10^{-8} UFC/mL) foram semeadas na ordem da maior diluição (10^{-8} UFC/mL) para a menor (10^{-1} UFC/mL), com auxílio de micropipetador e ponteiros esterilizados descartáveis, para cada tubo correspondente, em cada linha, exceto o tubo controle.

Desta forma, havia em cada linha, 8 tubos de ensaio contendo o meio de cultura líquido (BHI), a solução desinfetante a ser testada (decocto ou extratos) e uma diluição logarítmica do inóculo bacteriano, além do tubo controle contendo meio BHI e o desinfetante a ser testado.

Após esta etapa, os tubos foram agitados utilizando aparelho vortex e colocados em estufa bacteriológica a 37° C para incubação aeróbia, por 24 horas. No dia seguinte em câmara de fluxo laminar, os tubos foram agitados novamente antes de serem plaqueados. O fundo de 8 placas de Petri com meio ágar nutriente foram divididos em 8

partes iguais com o auxílio de caneta apropriada tipo “pilot”. Cada parte recebeu identificação referente a uma diluição. Quatro placas para a linha sem desinibidor e quatro placas para a linha com os desinibidores. Desta forma as quatro bactérias testadas foram contempladas, com suas respectivas oito diluições. Com auxílio de uma alça de platina calibrada (5 mm de diâmetro), previamente flambada, alíquotas de cada tubo foram semeadas nas respectivas diluições assinalada na placa. As placas semeadas foram colocadas invertidas em estufa bacteriológica a 37° C, por 24 horas de incubação aeróbia. No dia seguinte procedeu-se a leitura e contagem das UFC/mL das mesmas e novas semeaduras em novas placas para prosseguir com as leituras 48, 72, e 144 horas.

Os resultados obtidos foram lidos como intensidade de atividade de inibição bacteriana (IINIB) e intensidade de atividade de inativação bacteriana (IINAB), primeiramente registrados em protocolo conforme modelo em anexo, em seguida digitados em planilhas para elaboração de tabelas e posteriormente avaliados através da Análise de Variância (Anova) e demais testes estatísticos, conforme as tabelas dos resultados em anexo.

Entende-se por IINIB/ Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/ bacteriostasia o resultado do confronto da bactéria com a solução antibacteriana em meio de cultura específico BHI, e por IINAB/ Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/ bactericidia, o mesmo resultado, porém sob a influência dos desinibidores bacterianos acrescentados ao meio, segundo Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft/ Sociedade Alemã de Medicina Veterinária (1981) e Reybrouck (1998), conforme descrito acima.

Estes resultados: IINIB (intensidade de atividade de inibição bacteriana/bacteriostasia) e IINAB (intensidade de atividade de inativação bacteriana/bactericidia) foram representados por variáveis ordinais arbitrárias, que assumiram valores de um (1) a nove (9), sendo que o valor 9 representa atividade máxima e 1 ausência de atividade, como ilustrado no **Quadro 3**. Desta forma, quanto mais alto o valor da variável, maior a dose infectante inibida ou inativada.

Quadro 3 - . Representação das variáveis IINIB (intensidade de atividade de inibição bacteriana) e IINAB (intensidade de atividade de inativação bacteriana), e suas correspondentes diluições e doses infectantes dos inóculos.

9	8	7	6	5	4	3	2	1	Variáveis ordinais de intensidade da ação
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}		UFC/mL- diluições do inóculo inibidas ou inativadas
10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0	n.a	UFC/mL- doses infectantes inibidas ou inativadas

IINIB = Intensidade da atividade de inibição bacteriana (bacteriostasia)

IINAB = Intensidade da atividade de inativação bacteriana (bactericidia)

UFC/mL = Unidade formadora de colônia por mililitro

n.a = nenhuma atividade

3.7 Teste de Suspensão

Na avaliação da atividade desinfetante e antisséptica dos extratos etanólicos e hidroetanólicos foram usadas as fases 1 e 2 do teste de suspensão proposto pelo comitê europeu (*Comité European de Normalization - European Commitee for Standardization*, CEN/TC 216, quais sejam: fase 1- teste de suspensão estabelecendo se a solução é bactericida; fase 2- teste de suspensão estabelecendo se a solução tem atividade antibacteriana simulando condições práticas de uso.

As técnicas de suspensão também seguiram as orientações de Deutsche Gesellschaft Für Hygiene Und Mikrobiologie/ Sociedade Alemã de Higiene e Microbiologia (1977), Rios *et al.* (1988), Reybrouck (1998) e Avancini (2002) e constaram dos seguintes testes:

3.7.1 Teste de Suspensão Simples

Sobre a bancada microbiológica, foram dispostos estandes contendo 33 tubos de ensaio com 5 mL de meio líquido BHI acrescidos de desinibidores bacterianos. Os tubos foram identificados da seguinte forma: quatro fileiras de oito tubos com as respectivas diluições logarítmicas (de -1 a -8), sendo a primeira fileira identificada com o nº 5, a segunda com o nº 15, a terceira com o nº 30 e a quarta com o nº 60, referentes ao tempo de atuação em minutos, do extrato frente a diluição logarítmica do inóculo testado. Um dos tubos serviu de controle, sem a presença de inóculo para verificar a esterilidade dos materiais.

Nove tubos de ensaio receberam 9 mL do extrato alcoólico de engaço de uva 'bordô' a 50%, sendo identificados de -1 a -8 e o último tubo, a letra C (controle).

Foi realizada a diluição serial logarítmica do inóculo bacteriano conforme descrito no subitem 3.3 (Seleção e preparo dos inóculos). A seguir, com uso de um cronômetro iniciaram-se as análises: no tempo zero, alíquotas de 1 mL das devidas diluições do inóculo bacteriano da maior diluição e conseqüentemente menor concentração 10^{-8} UFC/mL para a menor diluição e maior concentração 10^{-1} UFC/mL, nesta ordem, foram semeadas com auxílio de micropipetador e ponteiras esterilizadas descartáveis, para os oito tubos de ensaio contendo 9 mL do extrato a ser testado. Cinco minutos a partir da primeira semeadura (10^{-8} UFC/mL), com auxílio de alça de platina calibrada para 0,05 mL e esterilizada em bico de Bunsen, transferiu-se alíquota para o tubo de ensaio contendo meio BHI e identificado como -8 na fileira do Tempo 5 minutos, repetindo-se para cada uma das demais diluições. Procedeu-se da mesma forma após 15, 30 e 60 minutos, semeando alíquotas para cada fileira de tubos respectivamente identificados.

Todos os tubos de ensaio com alíquotas correspondentes aos tempos de exposição do inóculo bacteriano e suas respectivas diluições, frente à concentração do extrato testado, foram incubados a 37° C e as leituras feitas em 24, 48, 72 e 144 horas. Em cada dia, após a leitura, novas alíquotas eram transferidas para novos tubos de ensaio contendo meio BHI, formando novos grupos de 4 tempos. Observou-se o crescimento bacteriano pela turvação dos meios. Para evitar resultados falsos, todos os tubos sem turvação, com turvação ou de turvação duvidosa, foram submetidos a plaqueamento em ágar nutriente para confirmação do resultado.

Alíquota do tubo C (controle com extrato e sem inóculo) foi transferido para o tubo '33' após 60 minutos, para verificar a esterilidade do teste. Após a incubação de 24 e 48 horas, foi plaqueado, independente se houvesse ou não turvação do meio.

Cada uma das três concentrações testadas do extrato alcoólico de engaço 'Bordô' foram analisadas em semanas diferentes, assim como suas respectivas repetições.

O resultado da leitura indica a dose infectante (diluição logarítmica) da bactéria testada que a concentração do extrato conseguiu inativar (bactericidia), em cada tempo de contato, conforme tabela em anexo.

3.7.2 Teste de Suspensão simulando condições práticas de uso

3.7.2.1 Teste de Suspensão com Suportes – a técnica foi desenvolvida com os mesmos fatores considerados para o teste de suspensão simples, acrescido o suporte pano de algodão e madeira em dois experimentos distintos. Foi testada a concentração 50% de extrato etanólico de engaço de uva 'Bordô', confrontando com oito diluições dos quatro inóculos bacterianos.

Técnica:

1º Passo: Sobre a bancada microbiológica, para cada inóculo a ser testado, foi colocado os seguintes conjuntos de vidraria previamente esterilizada em autoclave: uma placa de Petri contendo 33 pedaços de pano de algodão (suporte), medindo aproximadamente 1cm X 1,5cm, esterilizados previamente. Oito tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada a 0,1% esterilizada; oito placas de Petri de 5 cm de diâmetro, que receberam cada uma 9 mL da diluição do inóculo; dezesseis placas de Petri contendo papel filtro absorvente, previamente esterilizados; oito placas de Petri que receberam o extrato a ser testado. Cada conjunto de placas recebeu a identificação de -1 a -8, correspondendo as diluições do inóculo. Quatro grupos de oito tubos de ensaio contendo 5 mL de meio BHI e os respectivos desinibidores, mais um tubo controle (total 33), foram também dispostos na bancada. Estes grupos foram identificados conforme o tempo de exposição (oito tubos -1 a -8) para 5 minutos; 15 minutos; 30 minutos e 60 minutos.

2º Passo: Após o preparo do extrato etanólico de engaço de uva 'Bordô' a 50%, 9 mL foram pipetados para as oito placas de Petri de recepção.

3º Passo: realizou-se a diluição serial logarítmica do inóculo bacteriano conforme descrito no subitem 3.3 (Seleção e preparo dos inóculos, Avancini, 2002), a partir do inóculo inicial, transferindo-se asépticamente, com auxílio de micropipetador e ponteiros descartáveis, 1mL deste para tubos de ensaio contendo 9 ml de água peptonada estéril a 0,1% para obter a diluição 10^{-1} , e assim sucessivamente até a diluição 10^{-8} .

4º Passo: Com o auxílio de uma pinça previamente esterilizada em autoclave e flambada no momento de uso, quatro suportes de pano de algodão foram colocados em cada uma das oito placas de Petri (-8 a -1). Verteu-se próximo a chama do bico de Bunsen, em cima dos suportes (pano de algodão), em cada placa, 9 mL de cada diluição do inóculo. Após 20 segundos de contaminação, com auxílio da pinça previamente flambada, foram virados uma vez. Após outros 20 segundos, eram retirados na mesma ordem e colocados nas placas contendo papel absorvente para enxugar o excesso de líquido. Após 30 minutos, iniciando pela placa -8, quatro suportes (pano de algodão) foram retirados e colocado na respectiva placa -8 contendo o extrato, marcando-se dois minutos, sendo os demais retirados na mesma ordem de entrada e colocados em outras placas contendo papel filtro absorvente, segundo processo de secagem, para continuidade da ação desinfetante.

5º Passo: Finalmente, após 5 minutos um suporte de cada diluição foi transferido com pinça pré flambada para os respectivos tubos do grupo 5 minutos, contendo BHI com desinibidores bacterianos, previamente identificados pelas diluições -8 a -1 .

6º Passo: As mesmas ações foram realizadas para todos os suportes, passando pelo primeiro processo de secagem, entrando em contato com o extrato por dois minutos, sendo transferidos para a segunda placa de secagem e, finalmente os suportes sendo colocados nos tubos de ensaio com 5 mL de BHI, nos respectivo tempos 15, 30 e 60 minutos.

Os tubos foram incubados em estufa a 37° C, com as leituras realizadas em 24, 48, 72 e 144 horas. Os testes controle foram realizados de forma idêntica ao teste de suspensão simples, exceto pela presença do suporte pano.

O teste de suspensão com o suporte madeira e suas repetições foram realizados de forma idêntica, em semanas diferentes. Os suportes utilizados mediam 1cm x 1cm x 05 cm, provenientes de madeira não tratada.

3.7.2.2 Teste de Suspensão com matéria orgânica

A técnica utilizada foi a mesma para o teste de suspensão simples, com a diferença de que na água destilada esterilizada utilizada para obter a concentração de 50% do extrato etanólico de engaço de uva 'Bordô', foi acrescentada a matéria orgânica albumina sérica bovina a 6% em quantidade suficiente para 20% do volume final; e em outro experimento acrescentou-se leite integral, também em quantidade suficiente para 20% do volume final.

Foram utilizadas apenas duas bactérias, uma Gram-positiva e uma Gram-negativa, em dois tempos de exposição: 30 e 60 minutos.

3.8 Polifenóis

3.8.1. Método de extração

A extração de polifenóis foi feita segundo a metodologia de Vinson *et al.* (2001). Amostras de 100 µL de extrato foram colocadas em tubos de rosca tipo Eppendorf acrescidos de 500 µL de solução de extração contendo metanol (Grupo Químico®/BR) a 50% e ácido clorídrico (Nuclear®/BR) a 1,2M. Os tubos, em triplicata, foram colocados em banho-maria a 90°C por três horas. Após este período, foram retirados do banho-maria e resfriados a temperatura ambiente e o seu volume foi completado para um mililitro (1 mL) com metanol puro (Grupo Químico®/BR). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (Centrifuge 5415R- Eppendorf®, Germany) a 5000 rpm por 5 minutos e os sobrenadantes obtidos constituíam os extratos de polifenóis (Faller e Fialho, 2009).

3.8.2. Determinação dos polifenóis

O Teor de polifenóis totais foi determinado pelo método de Folin e Ciocalteu, no qual, segundo Moyer *et al.* (2002), a mistura dos ácidos fosfowolfrâmico e fosfomolibdico em meio básico se reduz ao oxidar os compostos fenólicos, originando óxidos azuis de wolframio (W_8O_{23}) e molibdeno (Mo_8O_{23}). A solução de Folin foi preparada utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (Merck) e água diionizada 1:1 (v/v). Alíquotas de 60 µL de cada um dos extratos de polifenóis extraídos foram transferidos para um tubo Eppendorf e acrescidos de 150 µL de Folin e deixado reagir por 5 minutos, e logo em seguida colocou-se 150 µL de carbonato de sódio (Synth®/BR) (20%) e 840 µL de água destilada e a solução ficou reagindo por 30 minutos. No fim, a

solução foi levada para o espectrofotômetro (Beckman 6300) e absorvância lida a 750 nm, tendo o ácido gálico (Merck®/BR) servido como padrão. O teor de fenóis totais foi então determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (10 a 150 µg/mL) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por 100g de extrato. A equação da curva de calibração do ácido gálico foi:

$y = 0,0053x + 0,0051$ onde y é a concentração do ácido gálico, x é a absorvância a 750 nm e o coeficiente de correlação $R = 0,993$.

Da equação obtém-se que

$$X = \frac{Y - 0,0051}{0,0053}$$

Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) em 100g de amostra. A curva padrão (Bora *et al.*, 2005) foi obtida utilizando-se soluções padrão de ácido gálico nas concentrações de 0, 25, 50, 75, 100, e 150 µg/mL. O gráfico da curva padrão de ácido gálico encontra-se em anexo.

3.9 Antocianinas

A determinação das antocianinas foi efetuada em triplicata pelo método de pH diferencial, conforme descrito por Giusti e Wrolstad (2001). A análise de antocianinas pelo método de pH diferencial consiste em efetuar leitura espectrofotométrica do extrato em tampão pH 1,0 e pH 4,5, baseando-se na sensibilidade destes compostos ao pH. Elevando-se o pH para 4,5 estabelece-se condição em que as antocianinas praticamente não apresentam coloração, apresentando menor absorção de energia. Por outro lado, abaixando-se o pH para em torno de 1,0, os pigmentos exibem coloração intensa. A diferença de absorvância observada em aparelho espectrofotômetro possibilita, por diferença direta, estimar a fração real de antocianina presente (Fuleki e Francis, 1968; citado por Teixeira *et al.*, 2008).

Em cada extrato aquoso obtido conforme o subitem 3.4 (método para obtenção dos extratos) foram transferidas apropriadamente, com ajuda de uma micropipeta, 200 µL e diluídos em 1800 µL de solução tampão correspondente: cloreto de potássio (Merck®/BR) 0,025 M, pH 1 e acetato de potássio (Merck ®/BR) 0,4 M, pH 4,5. Após

15 min em repouso à temperatura ambiente (25 ± 2 °C), foram feitas as medidas de absorvância a 540 nm e 700 nm (Kuskoski *et al.*, 2006) em aparelho espectrofotômetro (Genesys™ 10 vis), utilizando cubetas de cristal, 1 cm de largura. Utilizou-se a seguinte equação para determinar a absorvância:

$$A = (A_{\text{máx.vis.}(540\text{nm})} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH1}} - (A_{\text{máx.vis.}(540\text{nm})} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH4,5}}$$

O cálculo das antocianinas foi calculado considerando a absorvidade molar (ϵ) de 26900 L/(cm* mol), peso molecular de 449,2 g/mol da cianidina 3-glicosídeo e os resultados expressos como mg de cianidina 3-glicosídeo 100/g utilizando a seguinte fórmula (Lima *et al.*, 2007, Teixeira *et al.*, 2008):

$$\text{Ant. Totais (mg/100g): } \frac{D.O. \times F.D. \times 1000 \times P.M.}{Fex \times m}$$

Onde:

D.O.= densidade optica do extrato (diferença entre 540-700nm)

F.D.= Fator de diluição: 250ml: 0,2 =1250 vezes menor

1000= 100 x 10

PM = Peso moleclar

Fex= Fator de Extinção: podem ser dois valores: 26.900 ou 29.500 (foi utilizado o valor 26.900)

m= massa da amostra (g da amostra em 0,2ml)

3.10 Análises estatísticas

Os resultados obtidos das diferentes análises geraram bancos de dados que foram submetidos ao Núcleo de Assessoria Estatística pertencente ao Departamento de Matemática da UFRGS para realização das análises estatísticas.

Foi realizada Análise de Variância Fatorial (ANOVA) para as variáveis respostas valores de IINIB e valores de IINAB, através do "General Linear Models Procedure" (PROC GLM) do Programa Statistical Analysis System (SAS).

Teste de Comparações Múltiplas de Tukey para comparar médias de cultivares, tipos de resíduos, bactéria e concentração – Variável resposta IINAB.

Foi realizada Análise de Variância (Anova) de medidas repetidas (tempo de exposição) para a variável resposta valores de IINAB através do Proc Mixed do Programa Statistical Analysis System (SAS).

Foi realizada Análise de Correlação Linear de Pearson, via Programa SPSS, entre as variáveis respostas valores de IINAB, Compostos Fenólicos de IINAB, valores IINIB e Compostos Fenólicos de IINIB.

Foi realizada Análise de Variância Não-Paramétrica de Kreuskal-Wallis para as variáveis respostas valores de IINAB e valores de IINIB (fator matéria orgânica).

Os quadros com resultados das análises estatísticas encontram-se em anexo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Resultados

A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) não foram as mesmas para os diferentes cultivares pesquisados, para os diferentes tipos de resíduos e principalmente, para os tipos de extrações.

A CIM dos extratos etanólicos do cultivar 'Bordô' foi 30% para casca e engaço; a CBM foi 40% para casca e engaço. Para folhas, as CIM e CBM foram 50%, exceto para a bactéria *Staphylococcus aureus*, cuja redução ocorreu em 5 diluições logarítmicas apenas.

A CIM e a CBM dos extratos hidroetanólicos do cultivar 'Bordô' foi 40% para engaço, mas somente contra bactérias Gram-negativas. A CIM 50% para engaço contra

bactérias Gram-positivas foi expressiva. A CBM 50% para engaçõ contra *Staphylococcus aureus* reduziu apenas 5 diluições logarítmicas.

As CIM e CBM dos extratos hidroetanólicos de folhas e de cascas não foram expressivas para nenhuma cultivar pesquisada.

A CIM e a CBM dos extratos etanólicos do cultivar ‘Isabel’ e do cultivar ‘Niágara Rosada’ foi 30% para engaçõ, exceto para uma bactéria. A CBM para a bactéria *Staphylococcus aureus* foi 40%, para ambos os cultivares.

A CIM e a CBM dos extratos etanólicos da casca e folha destes cultivares não tiveram resultados expressivos.

A CIM e a CBM dos extratos hidroetanólicos do cultivar ‘Isabel’, ‘Moscatõ’ e ‘Niágara Rosada’ para engaçõ não tiveram resultados expressivos.

A CIM e a CBM dos extratos etanólicos do cultivar ‘Moscatõ’ foi 30% para engaçõ; entretanto, a casca e folha não tiveram resultados expressivos.

Todas as análises realizadas com decocto (100 g de amostra seca em 1 litro de água destilada) de todos os cultivares pesquisados, não apresentaram atividade antibacteriana.

O extrato etanólico de engaçõ do cultivar ‘Bordõ’ a 50% foi selecionado para realizar o teste de suspensão (tempo de exposição, presença de suporte e presença de matéria orgânica), porque foi considerado o melhor resultado (valor de IINIB e IINAB máxima 9), para todas as bactérias e maior quantidade de polifenóis totais.

Os resultados quantitativos da atividade antibacteriana: Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana (IINAB), bem como os resultados dos polifenóis totais quantificados dos diferentes extratos, encontram-se em tabelas (apêndice).

As análises de antocianinas foram realizadas para todas as amostras de extratos, porém encontradas somente nas cascas de dois cultivares. O cultivar ‘Moscatõ’ não possui antocianina.

A relação dos teores de polifenóis totais e a atividade antibacteriana foram determinadas através da análise de Correlação Linear de Pearson, entre as variáveis respostas valores de IINAB, Compostos Fenólicos de IINAB, valores IINIB e Compostos Fenólicos de IINIB (em anexo). Concluiu-se que existe correlação positiva entre valores de IINIB e IINAB e os valores dos Compostos Fenólicos, $p < 0,0001$, ou

seja, à medida em que os valores de IINIB e IINAB aumentam, os valores dos Compostos Fenólicos também aumentam.

A relação entre os teores de antocianinas e a atividade antibacteriana não pôde ser determinada, porque a maioria das amostras não apresentou antocianinas, embora apresentasse atividade antibacteriana bastante expressiva, exemplo extrato de engaço.

Através da Análise de Variância, foi possível concluir que o efeito de Cultivar, Tipos de Método de Extração, Tipos de Resíduo, Bactéria e Concentração é significativo, $p < 0,0001$ para todos os fatores, em relação a variável resposta valores de IINAB.

Através do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, foi possível concluir, que a nota média da Intensidade de atividade de inativação bacteriana (IINAB) do Cultivar ‘Bordô’ difere significativamente do valor médio de IINAB dos Cultivares ‘Isabel’ e ‘Moscato’, $p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente.

Através do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, foi possível concluir, que o valor médio de IINAB da Bactéria *Staphylococcus aureus* difere significativamente do valor médio de IINAB da Bactéria *Escherichia coli*, *Enterococcus Faecalis* e *Salmonella* Enteritidis, $p < 0,0001$, $p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente. *Staphylococcus aureus* foi a bactéria mais resistente.

Através do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, foi possível concluir, que o valor médio de IINAB do Resíduo Casca difere significativamente dos valores médios de IINAB dos demais Tipos de Resíduo, $p < 0,0001$.

Através do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, foi possível concluir, que o valor médio de IINAB da Concentração 20% difere significativamente dos valores médios de IINAB das demais Concentrações com $p < 0,0001$.

Através da Análise de Variância, foi possível concluir que o efeito de Bactéria, Suporte e Tempo de Exposição é significativo, $p = 0,0311$, $p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente, em relação à variável resposta valor de IINAB.

Através do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, foi possível concluir, que o valor médio de IINAB da Bactéria *Escherichia coli* difere significativamente do valor médio de IINAB da Bactéria *Enterococcus faecalis*, $p = 0,0259$. Da mesma forma, foi possível concluir que, por exemplo, o valor médio de IINAB do Suporte Madeira difere significativamente do valor médio de IINAB do Suporte Pano e do teste Sem Suporte, com $p < 0,0001$ para ambas comparações.

Através da Análise de Variância Não-Paramétrica de Kruskal-Wallis, foi possível concluir que existe diferença significativa entre os “Ranks” médios dos valores de IINAB do Fator Matéria orgânica - Bactéria (combinação de Material Orgânico e Bactéria), $p < 0,0001$.

Os quadros das respectivas análises estatísticas encontram-se em anexo.

No teste de suspensão com extrato etanólico de engaço do cultivar ‘Bordô’ a 50%, em trinta minutos de ação, foi possível observar a inativação de todas as quatro bactérias testadas.

É interessante destacar também que em todas as análises de atividade antibacteriana realizadas, as leituras de 48, 72 e 144 horas não sofreram alteração, portanto, a variável ‘tempo de leitura’ não foi considerada para análises estatísticas.

Desta forma, utilizar extratos de resíduos da vitivinicultura, em especial o extrato de engaço como desinfetante na agroindústria familiar de produtos de origem animal é possivelmente viável, desde que se faça anteriormente a remoção da matéria orgânica local, conforme demonstrado nas tabelas 19 e 20 respectivamente.

A utilização como antisséptico em produção animal, só poderia ser usado se aprovado em testes cutâneos alérgicos de sensibilidade imediata. Sua utilização possui restrições, uma vez que demonstrou ter melhor atividade antibacteriana em presença de leite integral do que em presença de albumina sérica bovina. Durante 30 minutos de exposição demonstrou ter melhor atividade antibacteriana contra bactéria Gram-negativa. Uma vez que o extrato de engaço possui em sua constituição o grupo fenol (hidroxibenzeno), que é contra indicado para uso como antisséptico, por ser corrosivo e irritante das membranas mucosas (PHENOL, 2007), não se recomenda o uso como antissépticos.

4.2 Discussão

Os extratos etanólicos foram os que apresentaram melhor resultado em relação aos extratos hidroetanólicos, pois de acordo com a Farmacopéia Brasileira, 2010, o grupo fenol é muito solúvel em etanol e possui as seguintes características:

Fenol

CAS – [108-95-2]

Fórmula e massa molecular – C₆ H₆ O – 94,11

Especificação – Contém, no mínimo, 98,0% (p/p).

Descrição – Massa cristalina ou cristais incolores ou fracamente róseos ou amarelados, de odor característico.

Deliquescente.

Características físicas – Temperatura de fusão: aproximadamente 43 °C. Temperatura de ebulição: aproximadamente 180 °C.

Solubilidade – Solúvel em água, muito solúvel em etanol, em glicerol e em cloreto de metileno.

Conservação – Em recipientes herméticos.

Armazenagem – Proteger da luz e do calor.

Rotulagem – Deve indicar o nome e a quantidade do estabilizante.

Segurança – Cáustico. Tóxico.

Categoria – Desinfetante.

Fonte: Farmacopéia (2010)

Passos *et al.* (2009) utilizando as mesmas metodologias de extração dos princípios ativos de plantas (talos, flores e folhas) também encontraram valores da atividade antibacteriana por extração etanólica superior aos demais tipos de extração, seguido pela hidroetanólica, decocto de planta seca e decocto de planta *in natura*. Uma hipótese para estas diferenças, sugerida pelos autores, pode estar relacionada à perda de componentes como óleos essenciais, com ênfase ao eugenol, cimen-8-ol e transcariofileno durante as extrações por decocção (ebulição), devido a temperaturas mais elevadas.

Sabendo-se que a temperatura de ebulição para o grupo fenol é aproximadamente 180° C; a temperatura de extração por decocção (100° C) não

interferiu neste grupo químico. E embora os fenóis sejam solúveis em água, no presente experimento, o decocto não apresentou nenhuma atividade antibacteriana contra as quatro bactérias testadas. Provavelmente o sistema de extração etanólica por evaporação rotatória, que é um circuito fechado, não permitiu a perda de princípios ativos por evaporação, o que não ocorreu no método de decocção, pois embora os frascos de Erlenmeyer estivessem tampados, no momento da ebulição houve perda de princípios ativos por não ser um circuito fechado.

Outros compostos presentes no decocto possuem elementos voláteis, além do fenol cuja pressão de vapor a 0,36 mmHg é igual a 20° C (Aldrich Chemistry, 2009-2010), justificando o resultado, conforme a hipótese sugerida por Passos *et al.* (2009).

Os resultados demonstram correlação positiva entre a Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana (IINAB) e os valores dos polifenóis totais (mg Equivalentes de Ácido Gálico em 100 gramas de amostra). À medida em que os valores de IINIB e IINAB aumentam, os valores dos Compostos Fenólicos também aumentam. Porém, não se pode afirmar que os polifenóis totais presentes nos extratos sejam responsáveis pela atividade antibacteriana encontrada, pois outros princípios ativos poderiam estar presentes atuando isoladamente ou em sinergismo.

Os desinfetantes fenólicos, saneantes com ação germicida e fungicida, são normalmente usados na desinfecção domiciliar, em ambientes coletivos ou públicos. A maioria destes produtos apresenta matriz complexa devido a grande quantidade de componentes em sua formulação, tornando-se difícil sua análise. Os métodos comumente empregados utilizam a técnica de cromatografia gasosa com elaboradas etapas de preparo de amostra, que podem não eliminar a ocorrência de picos interferentes (MACHADO *et al.*, 2009).

O teor de polifenóis totais encontrado na pesquisa variaram conforme o resíduo e conforme o cultivar utilizado.

De acordo com Malacrida e Motta, (2005) e Abe *et al.* (2007), os teores de compostos químicos variam muito entre os cultivares e, portanto, os conteúdos de fenólicos totais e de antocianinas nas uvas variam de acordo com a espécie, variedade, maturidade, condições climáticas e cultivar.

Variações no perfil de compostos polifenólicos produz uvas com sabores e cores variadas. Os autores sugerem que a variação no perfil dos compostos fenólicos pode

resultar em diferentes respostas biológicas, e que apesar de apresentarem alguns constituintes em potenciais, outros compostos podem estar agindo sinergisticamente, contribuindo para os efeitos benéficos.

Freitas (2006), verificou que a safra 2004 continha mais polifenóis que a safra 2003, porque houve menor precipitação pluvial, maior insolação e menor umidade relativa do ar, condições favoráveis para a maturação fenólica das uvas.

Cachos de uva triturados e liofilizados de cinco cultivares de Minas Gerais foram analisados por Abe *et al.* (2007) e o conteúdo de fenólicos totais foi determinado através do método de Folin-Ciocalteu. Os resultados encontrados variaram entre 65 e 390 mg equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de amostra base úmida. Os resultados encontrados nesta pesquisa variaram entre 25 mg para folhas do cultivar 'Moscato' e 477 mg para engajo do cultivar 'Bordô', utilizando a mesma metodologia.

O conteúdo de antocianinas totais (mg em 100 gramas de amostra equivalentes de cianidina-3-glicosídeo), determinado pelo método do pH diferencial, variou entre 12,8 mg para a uva 'Niágara Rosada' e 248 mg para a uva 'Bordô', encontrados pelos autores citados acima. Nesta pesquisa os resultados encontrados foram 73,9 mg para extrato etanólico da casca de uva 'Isabel' e 98,1 mg para o extrato etanólico da casca de uva 'Bordô', referente ao conteúdo de antocianinas totais (mg em 100 gramas de amostra equivalentes de cianidina-3-glicosídeo), também determinado pelo método do pH diferencial.

De acordo com Mallacrida e Motta (2006), o teor de antocianina em uvas tintas pode variar de 30 mg até 750 mg por 100 gramas de fruta madura.

Mutações em dois genes reguladores das uvas brancas desativam a produção de antocianinas, por isso não foi encontrada antocianina no cultivar 'Moscato'.

A literatura comprova atividade antibacteriana de extrato de semente de uva desengordurada em trabalhos semelhantes, com ênfase em aproveitamento de resíduos. Santos (2009) quantificou o teor de compostos fenólicos de semente de uva desengordurada, encontrando valores superiores ao das outras partes do fruto. Com destaque para os cultivares 'Niágara' e 'Isabel', variando de 89,83 a 122,35 mg Equivalente de Ácido Gálico por 100 gramas da amostra.

Pesquisas relacionadas a simulações de condições de uso, podem ser comparadas ao presente trabalho:

Kich *et al.*, (2004) avaliaram desinfetantes frente a 8 amostras de *Salmonella Typhimurium*, com diferentes perfis de resistência a antimicrobianos, por um tempo de

contato de 5 minutos. Todos os desinfetantes foram eficazes na ausência de matéria orgânica e nas duas temperaturas testadas. Entretanto, quando na presença de matéria orgânica, somente o hipoclorito de sódio (1%), fenol e o ácido peracético foram eficazes. As observações indicam que a eficácia dos desinfetantes frente às amostras de *Salmonella* sp. esteve mais relacionada com as condições de utilização, principalmente quanto à presença de matéria orgânica e tempo de exposição, do que com o perfil de resistência apresentado pelas diferentes linhagens.

Cony *et al.* (1998) conduziram dois experimentos com o objetivo de avaliar a eficiência de diferentes princípios ativos desinfetantes e dois métodos de desinfecção de ovos. No primeiro experimento, as desinfecções foram realizadas por pulverização, enquanto que no segundo foram feitas por imersão, em granja de reprodutoras pesadas imediatamente após a postura. Os experimentos foram constituídos por um tratamento sem desinfecção e outros seis utilizando soluções desinfetantes: fenol sintético, digluconato de clorexidina, amônia quaternária, amônia quaternária + uréia, amônia quaternária + glutaraldeído e formaldeído. Em cada experimento houve tratamentos-controle com fumigação (formaldeído) e sem desinfecção alguma. Após a desinfecção, 40 ovos por tratamento foram avaliados para presença de mesófilos totais, bolores e leveduras, coliformes totais, *Pseudomonas* sp e *Aspergillus* sp. De um modo geral, os desinfetantes estudados apresentaram capacidade de ação na redução da contaminação microbiana da casca de ovos incubáveis. Todos os desinfetantes também demonstraram ser seguros sob o ponto de vista de sobrevivência dos embriões, sem grandes restrições.

5. CONCLUSÕES

Resíduos da viticultura, em especial o engaço, são ricos em compostos fenólicos que certamente, desperta interesse em novas pesquisas tecnológicas com ênfase em baratear sua forma de extração. O seu aproveitamento como desinfetante na produção animal e na agroindústria familiar de produtos de origem animal, com base nos resultados desta pesquisa, é eficaz.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Houve uma preocupação maior para a coleta de amostras, buscando somente resíduos provenientes de cultivo orgânico. O sistema convencional para produção de uvas recebe alguns tratamentos fitossanitários com a finalidade de proteger a planta de certas doenças, o que pode deixar traços de resíduos químicos detectados na casca, folha ou engaço. Leituras falso negativas ou positivas, devido a presença de resíduos de agrotóxicos, poderia levar a interpretações erradas da atividade antibacteriana. Desta forma, eliminou-se este fator externo (presença de resíduos de agrotóxicos) para não interferir nos resultados da pesquisa.

A uva ‘Niágara Rosada’ produzida em cobertura plástica (doação da Embrapa Uva e Vinho), não recebeu nenhuma utilização de produtos químicos, nem mesmo a calda bordalesa, produto considerado orgânico. Por este motivo, casca e engaço deste cultivar, foram utilizados para preparo de alcoolaturas afim de comparar com os demais cultivares que receberam calda bordalesa, para um maior controle da atividade antibacteriana. O resultado da análise da atividade de bacteriostasia/bactericidia dos resíduos do cultivar ‘Niágara Rosada’, encontra-se na **Tabela 13**, (em apêndice).

Para assegurar um melhor controle, foi realizado análise de atividade antibacteriana da calda bordalesa, simulando as mesmas análises de atividade antibacteriana para “desinfetantes testes”: Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB - ausência de desinibidores bacterianos) e Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB – presença de desinibidores bacterianos). Utilizou-se Calda Bordalesa em duas concentrações (100% e 50%), confrontando com as quatro bactérias testadas: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*

faecalis, *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli*. Os resultados (conforme **Tabela 14**, em apêndice), demonstraram que, embora ocorra inibição na concentração 100%, não foi significante para mascarar os resultados. De acordo com Motta (2008), a calda bordalesa possui efeito secundário contra bacterioses, em videiras. Sua utilização é recomendada como fungicida.

Os resultados encontrados com extrato alcóolico de engaço, foram superiores a casca e a folha, portanto, bastante promissores. A quantidade de compostos fenólicos que podem ser extraídos dos engaços abrem portas para novas pesquisas referentes a metodologia de extração, separação por fases, utilização prática destes princípios químicos, entre outras.

O volume de engaço gerado pela viticultura continuará sendo elevado; o material continuará recebendo maiores cuidados para que sua decomposição seja acelerada, porém, é um resíduo que possui valor agregado bastante significativo, conforme demonstrado nos resultados das análises de atividade antibacteriana e de teores de polifenóis. Sua utilização prática como desinfetante a ser utilizado em instalações animais, agroindústria familiar de produtos de origem animal, é viável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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 vinifera L.* **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 27, n. 2, p. 394-400, abr.-jun. 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENOLOGIA/ABE. 2011. **Histórico**. Disponível em: <<http://www.enologia.org.br/abe/historico>>. Acesso em: 20 maio 2012.
- ACHA, P. N.; SZYFRES, B **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al humane y a los animales**. 3 ed. Washington: World Health Organization. Cientifical and Technical Publication. n. 580. 2003, 398p.
- ADUBARE. **Composto orgânico**. Disponível em: <<http://www.adubare.com.br/produtos.html>>. Acesso em: 16 fev. 2013.
- AKERELE, O. Medicinal Plants and Primary Health Care: an Agenda for Action. **Fitoterapia**, Milano, v. 59, n.5, p. 355-363, 1988.
- AKERELE, O. Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. **Foro Mundial de la Salud**, Caracas, v. 14, n.4, p.390-395, 1993.
- ALBUQUERQUE, T. C. S. de; *et al.* Resíduos da vinificação no preparo de compostos orgânicos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 9, In. REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 6,. Bonito, 2006. **Anais...** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2006.
- ALDRICH handbook of fine chemicals. Milwaukee: Sigma-Aldrich, 2009-2010.
- ALONSO, A. M.; GUILLEÁN, D. A.; BARROSO, C. G.; PUERTAS, B.; GARCÍA, A. Determination of Antioxidant Activity of Wine Byproducts and its Correlation with Polyphenolic Content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Ádiz, v. 50, n. 21, p. 5832-5836, 2002.
- ALTIERI, M. **Agroecologia**: a dinâmica produtiva da agricultura sustentável. 4. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2004. 110 p.
- ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASIMIRO, L. A. *et al.* Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

ANASTASIADI, M.; CHORIANOPOULOS, N. G.; NYCHAS, G. J. Antilisterial Activities of Polyphenol-Rich Extracts of Grapes and Vinification By-Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 2, p. 457-463, 2008.

ANDREWS, J. M. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, Birmingham, v. 48, p. 5-16, 2001.

ARAÚJO, C. D.; CARVALHO, H. H.; WIEST, J. M. Inativação de *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli* por extrato aquoso de alho nirá (*allium tuberosum* e *Sprengl*) – *Liliaceae* – em simulação alimentar. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 23, n. 176/77, p. 135-140, 2009.

ARAÚJO, G.G.L. Resíduo da uva processada para vinho é transformada em produto forrageiro. **Revista A Lavoura**. Junho/2008. p.23.

ARAÚJO, G. G. L. **Resíduo da uva processada para vinho é transformada em produto forrageiro**. 2007. Disponível em:
<http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/noticias/2007/junho/3a-semana/noticia.2007-06-18.2890923758#> Acesso em maio 2012.

AVANCINI, C.A.M. **Saneamento aplicado em saúde e produção animal: etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas do sul do Brasil e teses de avaliação do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham e Schlecht – Hipericaceae (Guttiferae) – (“escadinha”/“sinapismo”) para uso como desinfetante e antisséptico**. 2002. 309f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M.; DALAGNOL, R.; HAAS, J. S.; Von POSER, G. L. Antimicrobial Activity of Plants Used in the Prevention and Control of Bovine Mastitis in Southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 27, n. 6, p.894-899, 2008a.

AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M. Atividade desinfetante do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham e Schlecht – Guttiferae (“escadinha/sinapismo”) frente a diferentes doses infectantes de *Staphylococcus aureus* (agente infeccioso em mastite bovina). **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 1, p. 64-69, 2008b.

AZEVEDO, E.; PELICIONI, M. C. F. Promoção da saúde, sustentabilidade e agroecologia: uma discussão intersetorial. **Saúde e Sociedade**, São Paulo, v. 20, n. 3, 2011.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic Compounds in Plants and Agro-Industrial By-Products: Antioxidant Activity, Occurrence, and Potential Uses. **Food Chemistry**, London, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BARCELÓ, J. G. Compuestos fenolicos in____. **Tecnicas analíticas para vinos**. Barcelona: Moja-Olèrdola, 1 ed. Cap. 8, p. 8.5 – 8.33. 1990.

BARCELOS, M. F. P. **Substâncias tóxicas naturais em alimentos**. Lavras: Faepe, p. 114, 2004.

BAXTER, R. A. Anti-Aging Properties of Resveratrol: Review and Report of a Potent New Antioxidant Skin Care Formulation. **Journal of Cosmetic Dermatology**, North Carolina, v. 7, n. 1, p. 2-7, 2008.

BAYDAR, N. G.; ÖZKAN, G.; SAGADIÇ, O. Total Phenolic Contents and Antibacterial Activities of Grape (*Vitis vinifera* L.) Extracts. **Food Control**, Guildford, v. 15, n. 5, p. 335-339, 2004.

BLAUTH, D. A. **Desenvolvimento de um Sig associado ao Cadastro Vitícola do RS, agregando técnicas de classificação de vinhedos a partir de imagens Aster**. 2007. 83 f. Dissertação (Mestrado em Sensoriamento Remoto) Centro estadual de pesquisas em sensoriamento remoto e meteorologia. Programa de Pós Graduação em Sensoriamento Remoto. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

BORA, K.; MIGUEL, O. G.; ANDRADE, C. A.; OLIVEIRA, A. O. T. de. Determinação da concentração de polifenóis e do potencial antioxidante das diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksonia sellowiana*, (Presl.) Hook, Dicksoniaceae. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 6, n. 2, jul.-dez. 2005.

BRASIL. **Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil**. 2. ed., São Paulo: Siqueira, 1959.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. Método de contagem em placa. 4. ed. São Paulo: Atheneu, Parte 1, v.5.1.6.1, 1988.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, v. 1, 5. ed., p. 457-458, 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1.pdf>. Acessado em: 2 mai. 2013.

BRASIL Farmacopeia Brasileira **Força Real dos Líquidos Espirituosos**. Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira, 2ª edição Rev. 02, 2012 Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/arquivos/2012/FNFB%20_Rev isao_2_COFAR_setembro_2012_atual.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/arquivos/2012/FNFB%20_Rev%20isao_2_COFAR_setembro_2012_atual.pdf) Acesso: 15 dezembro de 2012.

BRASIL. Lei nº 11.476, de 29/05/2007. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2007/Lei/L11476.htm>. Acesso em: 12 mar. 2013.

BRASIL. Lei nº 12.305, de 02/08/2010. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/112305.htm>. Acesso em 12 jan 2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Compostagem**. Brasília, 2013. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/component/k2/item/7594>>. Acesso em: 20 mar 2013.

CAMARGO, U. A. **Uvas do Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 1996. 90p.

CAMARGO, U. A. Porta-enxertos e cultivares de videira. **Porta-enxertos**, Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008. Disponível em: www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/viticultura/portaenx.html>. Acesso em: 31 mar. 2013.

CAMARGO, U. A. **Uvas para processamento**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2011. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/uva_para_processamento/arvore/CONT000g5f8cou802wx5ok0bb4szwyx060i6.html>. Acesso em: 21 fev. 2013.

CAMPOS, L. M. A. S. **Obtenção de extratos de bagaço de uva *Cabernet Sauvignon* (*Vitis vinifera*):** parâmetros de processo e modelagem matemática. 2005. 123f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

CARVALHO, H. H.; CRUZ, F. T.; WIEST, J. M. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS, Brasil. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 7, n. 3, p. 25-32, 2005.

CARVALHO, H. H. WIEST, J. M.; GRECO, D. P. Atividade antibacteriana e preditividade do condimento *Artemísia dracunculifera* L. (*Asteraceae*), variedade inodora - estragão – frente a *Salmonella* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.1, p. 75-79, jan-mar, 2006.

CASTAGNA, S. M. F.; SCHWARZ, C. W.; CANAL, C. W. *et al.* Presença de *Salmonella sp.* no trato intestinal e em tonsilas/linfonodos submandibulares de suínos ao abate. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.56, n.3, p. 300-306, 2004.

CAVALLI-SFORZA, L. **Biometrie: Grundzüge biologisch-medizinische Statistic (Biometria: fundamentos de estatística virológica-médica)**. Stuttgart: Gustav Fisher V. 1974. p.201-204.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA/CEPEA – DEAS - ESALQ - USP. **Relatório Pib Agro Brasil 2012**. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/comunicacao/Cepea_PIB_BR_dez12.pdf>. Acesso em: 04 jun. 2013.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA/CEPEA - DEAS - ESALQ - USP. Pib Agro CEPEA-USP CNA. **Pib do Agronegócio Análise de 2012, Análise de março/2013**. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br>>. Acesso em: 04 jun. 2013.

CERRI, C. E. P. **Compostagem**. Piracicaba, 2008. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Compostagem_000fhc8nfqz02wyiv80efhb2adn37yaw.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2013.

CHAN, M. M. Y. Antimicrobial Effect of Resveratrol on Dermatophytes and Bacterial Pathogens of the Skin. **Biochemical Pharmacology**, Philadelphia, v. 63, n.2, p. 99-104, 2002.

CENTRO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS DE BENTO GONÇALVES/ CIC-BG. **Bento Gonçalves. Panorama socioeconômico**, 2010. Disponível em: <<http://www.cicbg.com.br>>. Acesso em: 18 jan. 2011.

CONDE, C.; *et al.* Biochemical Changes throughout Grape Berry Development and Fruit and Wine Quality. **Food**, Braga, v. 1; n. 1: p.1-22, 2007.

CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 12., 2008, Bento Gonçalves/RS. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008. 187 p. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/anais/cbve12/cbve12.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2011.

CONY, H. C.; VIEIRA, S. L.; BERRES, J. Técnicas de pulverização e imersão com distintos desinfetantes sobre ovos incubáveis. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, ago. 2008.

COORDENAÇÃO DE AGROECOLOGIA/Coagre. **Nota Técnica nº 11/2012:** procedimentos para registro, rotulagem e internalização de produtos orgânicos no âmbito do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2012. Disponível em: <http://www.ibd.com.br/Media/arquivo_digital/524c1ff7-d617-47b3-be01-6a3b7ac8ea38.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2013.

CORRÊA, C.B. **Potencial antimicrobiano de resíduos agroindustriais sobre *Listeria monocytogenes***. 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

DA SILVA, D.C. **Identificação e caracterização do perfil transcricional de genes durante o desenvolvimento inicial do fruto em videira sem sementes (*Vitis vinifera* L. Cv. ‘sultanina’)**. 2010. 185 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

DA SILVA, L.M. L.R. **Aproveitamento de subprodutos da vinificação**. Viseu. ESAV, 2002. Disponível em: <http://www.ipv.pt/millennium/millennium28/10.pdf>. Acesso em: 18 fev. 2011.

DA SILVA, L.M.L.R. **Caracterização dos subprodutos da vinificação**, Viseu. Millenium, v. 28, p. 123-133, out. 2003.

DA SILVA, R. S. **Controle de degrane e conservação pós-colheita sob CaCl₂ e 1-MCP de uva ‘Isabel’ produzida no Vale do Siriji (PE/PB)**. 2010b. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Tecnologia. Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010b.

DAL’OSTO, M. C.; MOTA, R.V. Emprego de baixas temperaturas na extração de compostos fenólicos durante a elaboração de vinhos Syrah. **Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**, Bento Gonçalves, n. 4, p. 36-44, 2012.

DAVID, J. M. P.; DAVID, J. P.; SANTOS, V. L. C. S.; SANTOS, M. L. S.; MOTA, M. D. Resveratrol: ações e benefícios à saúde humana. **Diálogos e Ciência**: revista eletrônica da Faculdade de Tecnologia e Ciências de Feira de Santana. Feira de Santana, ano V, n. 10, p.1-11, 2007.

DE CAMARGO, V. O. **Entre resistências e inserções: a construção da Agroecologia na Embrapa**. 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado em Sociologia) – Programa de Pós-Graduação em Sociologia. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

DE OLIVEIRA, D. A. **Caracterização fitoquímica e biológica de extratos obtidos de bagaço de uva (*Vitis Vinifera*) das variedades Merlot e Syrah**. 2010. 211 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

DESHPANDE, S. S.; CHERYAN, M.; SALUNKE, D. K. Tannin Analysis of Food Products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 24, n. 4, p. 401-449, 1986.

DETONI, A. M.; CLEMENTE, E.; BRAGA, G. C.; HERZOG, N. F. M. Uva "Niágara Rosada" cultivada no sistema orgânico e armazenada em diferentes temperaturas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 3, 2005.

DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR HYGIENE UND MIKROBIOLOGIE (Sociedade Alemã de Higiene e Microbiologia) **Richtlinien für die prüfung chemischer desinfektionsmittel** (Normas para testes de desinfetantes químicos). In: BORNEFF J. Zblt. Bakt. In: BORNEFF J. Zblt. Bakt. Hyg., I Abteilung, Originale B. Stuttgart, G.Thieme Verlag, p. 397-411; 1977.

DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT (Sociedade Alemã de Medicina Veterinária). **Richtlinien zur prüfung chemischer desinfektionsmittel für die veterinärmedizin** (Normas para testes de desinfetantes químicos para a Medicina Veterinária). In: SCHLIESSER, Th.; Strauch D. Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch – und Milchwirtschaft. Stuttgart, Enke Verlag, p. 47-55 p. 47-55, 1981.

ECHEVERRY, C.; *et al.* Cytoprotection by neural of Tannat red wine against oxidative stress-induced cell death. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, p. 7395-7399, 2004.

ECOCERT BRASIL. Produtos orgânicos. **Certificação auditada 2003**. Disponível em: <<http://www.ecocert.com.br/organicos.html>>. Acesso em: 27 maio 2013.

ECOCERT BRASIL **Certificação de orgânicos**. 2011 Disponível em: <<http://www.ecocert.com.br/organicos.html>> Acesso 27 de maio de 2011.

EMBRAPA UVA E VINHO. **Histórico da Embrapa Uva e Vinho**. 2008. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/unidade/historico.html>>. Acesso em: 20 maio 2012.

EMBRAPA UVA E VINHO. Publicações: “Área e produção de uvas: panorama mundial”, **“Vitivinicultura brasileira: Panorama 2009”**. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/ano.html#a2009>>. Acesso em: 12 maio 2012.

EOWC - European Organic Winemaking **Carta**. Disponível em: <http://www.organic-market.info/web/News_in_brief/Policy/EOWC/176/191/0/9769.html>. Acesso em: 1º fev. 2012.

FALCÃO, A. A. **Análise química de resíduos sólidos para estudos agroambientais**. 2005, 97 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química. Departamento de Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

FALCÃO, A. P.; *et al.* Índice de polifenóis, antocianinas totais e atividade antioxidante de um sistema-modelo de geléia de uvas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.3, p.637-642, jul.-set. 2007.

FALLER, A. L. K.; FIALHO, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 211-218, 2009.

FAMUYIWA, O. O.; OUGH, C. S. Effect of Structural Constituents of Cell Wall on the Digestibility of Grape Pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 4, 1990.

FERNÁNDEZ-CANO, L.H.; TOGORES, J. H. **Tratado de viticultura**. Madrid: Ediciones Mundi Prensa, Tomo I, 4. ed., cap. I, 2011. 1031 p.

FERREIRA, T. A. M. C. **Desenvolvimento de biocompostos com base das fibras de engaço de uva**. 2010. 92f. Dissertação (Mestrado em Materiais Derivados de Recursos Renováveis) – Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2010.

FERREIRA, J.; *et al.* **Agro-sanus** – Agricultura biológica, 2008. Disponível em http://www.agrosanus.pt/agr_biologica.html. Acesso em: 30 jan. 2012.

FILIP, V.; *et al.* Resveratrol and its Antioxidant and Antimicrobial Effectiveness. **Food Chemistry**, London, v. 83, n.4, p. 585-593, 2003.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**, Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.

FREITAS, D. M. DE. **Variação dos compostos fenólicos e de cor dos vinhos de uvas (*Vitis vinifera*) tintas em diferentes ambientes**. 2006. 42 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinária) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

FREITAS, L. S. **Desenvolvimento de procedimentos de extração do óleo de semente de uva e caracterização química dos compostos extraídos**. 2007. 205 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

FULEKI, T.; FRANCIS, F.J. Quantitative Methods for Anthocyanins: 1. Extraction and Determination of Total Anthocyanin in Cranberries. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 33, n.1, p.72-77, 1968.

GIOVANNINI, E. **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. Porto Alegre: Renascença, 1. ed., 1999, 362 p.

GIOVANNONI, J. Molecular Biology of Fruit Maturation and Ripening. Ann. **Journal Plant Physiology**, Chicago, n.52, p. 725-749, 2001.

GIOVANNINI, E. **Uva agroecológica**. Porto Alegre: Renascença, 2001. 124 p.

GIOVANNINI, E. **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. Porto Alegre: Renascença, 3. ed., 2008. 368 p.

GIOVANNINI, E.; MANFROI, V. **Viticultura e enologia. Elaboração de grandes vinhos nos terroirs brasileiros**. Bento Gonçalves: IFRS, 2009. 344 p.

GIROLOMETTO, G. **Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hill. (“erva-mate”) frente a bactérias zoonóticas em saúde e produção animal**. 2005. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Antocyanins: Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. In: Wrolstad, R. E. (Ed.). **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, New York: John Wiley & Sons, 2001. Unit F1.2.1-13.

GÖKTÜRK BAYDAR, N.; ÖZKAN, G.; ÇETIN, E. S. Characterization of Grape Seed and Pomace Oil Extracts. **Grasas y aceites**, Washington, v. 58, n. 1, p. 29-33, 2007.

GUERRA, C. G.; ZANUS, M. C. **Uvas viníferas para processamento em clima temperado**. Bento Gonçalves: EMBRAPA. Sistema de produção, 4, Jul, 2003.

GUERRA, C.G. Vinho tinto. In: Venturini Filho, W. G. **Bebidas alcoólicas: Ciência e tecnologia**. São Paulo: Blucher, cap. 11, 209-233; 2010.

HASHIZUME, T. Tecnologia do vinho. In: _____. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. Cap. 2, v. 4, p. 21-68.

HECHT, S. B. A evolução do pensamento agroecológico. In: ALTIERI, Miguel. **Agroecologia: bases científicas para uma agricultura sustentável**. Guaíba: Agropecuária, 2002. p. 21-51.

HIDALGO, L. **Tratado de viticultura general**. Madrid: Ediciones Mundi Prensa, 3. ed., 2002. 1235 p.

HIDALGO, L. **Poda de la vid**. Madrid: Ediciones Mundi Prensa, 6. ed., 2003. 281 p.

HOGAN, S.; ZHANG, L.; LI, J.; ZOECHKLEIN, B.; ZHOU, K. Antioxidant Properties and Bioactive Components of Norton (*Vitis aestivalis*) and Cabernet Franc (*Vitis vinifera*) Wine Grapes. **Food Science and Technology**, Oxford, v. 42, p. 1269-1274, 2009.

HOU, D.X. Potential Mechanisms of Cancer Chemoprevention by Anthocyanins. **Current Molecular Medicine**, Sharjah, v. 3, n.2, p. 149-159, 2003.

IAMAMOTO, A.T.V. **Agroecologia e desenvolvimento rural**. 2005. 79 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

IBRAVIN. **Principais regiões produtoras**. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/regioesprodutoras.php>>. Acesso em: 24 fev 2011.

IBRAVIN/MAPA/SEAPPA-RS. **Cadastro vinícola**. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/admin/UPLarquivos/220220111851472.pdf>>. Acesso em: 31 mai 2011.

IFRS-BG. **Histórico**. Disponível em: <<http://www.bento.ifrs.edu.br>>. Acesso em: 31 mar. 2013.

IURKO, P.M.; *et al.* **Caracterização dos vinhos em tinto, branco e rosado, destacando seus componentes, principalmente o resveratrol**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Ponta Grossa - Paraná – Brasil: 1981-366X v. 02, n. 40, 2008.

JAILLON, O.; *et al.* The Grapevine Genome Sequence Suggests Ancestral Hexaploidization in Major Angiosperm Phyla. **Nature**, London, v. 449, n. 7161, p. 463-7, 2007. Disponível em:
<<http://www.nature.com/nature/journal/v449/n7161/full/nature06148.html>>. Acesso em: 26 mar 2013.

JAYAPRAKASHA, G.K.; SELVI, T.; SAKARIAH, K.K. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. **Food Research International**, Essex, v. 36, n. 2, p. 117-122, 2003.

JORDÃO, A. M. **Estrutura e composição das proantocianidinas da uva. Evolução ao longo da maturação**, 2000. Disponível em:

<<http://repositorio.ipv.pt/bitstream/10400.19/908/1/Estrutura%20e%20composi%C3%A7%C3%A3o%20das.pdf>>. Acesso em 28/01/2013.

KAUR, M.; AGARWAL, C.; AGARWAL, R. Anticancer and Cancer Chemopreventive Potential of Grape Seed Extract and Other Grape-Based Products. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, 2009. Disponível em:

<<http://jn.nutrition.org/content/139/9/1806S.long>>. Acesso em: 03 de agosto de 2012.

KAROU D., *et al.* Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. **African Journal of Biotechnology**, Bowie, v.4, n.8, p. 823-828, 2005.

KATALINIC, V.; *et al.* Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). **Food Chemistry**, London, v. 119, n. 2, p. 715-723, 2010.

KAUR M.; AGARWAL C; AGARWAL R. Anticancer and cancer chemopreventive potential of grape seed extract and other grape-based products. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.139, n.9, p. 1806-12, Sep. 2009.

KICH, J. D.; *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana de seis desinfetantes comerciais frente a amostras de *Salmonella typhimurium* isoladas de suínos. **Acta scientiae veterinariae**. Porto Alegre, RS. v. 32, n. 1, p. 33-39, 2004.

KIEHL, E. J. **Fertilizantes orgânicos**. São Paulo: Ceres, 1985, 492p.

KLAJN, V. M.; PIOVESANA A.; BUENO, M.M. **Elaboração e análise sensorial de biscoitos de farinha de bagaço de uva e aveia**. Passo Fundo VII Simpósio de Alimentos UPF ISSN 2236-0409. v. 7, 2011, p. 1/7

KUSKOSKI, E.M.; *et al.* Frutas Tropicais Silvestres e Polpas de Frutas Congeladas: Atividade Antioxidante, Polifenóis e Antocianinas. **Revista Ciência Rural**. Santa Maria, v. 36, n.4, p.1283-1287, 2006.

LEÃO, P. C. de S.; SOARES, J. M. RODRIGES, B. L. Principais Cultivares. In: SOARES, J. M; LEÃO, P. C. de S (Eds.) **A vitivinicultura no Semiárido brasileiro**. Petrolina, PE: Embrapa Semiárido, 2009, p. 599-656

LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A. E GUERRA, N. B.. Correlação entre o teor de antocianinas e caracterização cromática de polpas de diferentes genótipos de aceroleira. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 10, n. 1, p. 51-55, jan./mar. 2007

LONA, A.A. **Vinhos: degustação, elaboração e serviço**. Porto Alegre: AGE, 8 ed., 2003.

LOULI, V.; RAGOSSIS, N.; MAGOULAS, K. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. **Bioresource Technology**. Essex, v. 92, n. 2, p. 201-208, 2004.

LULU, J. **Duração do período de molhamento em vinhedo de ‘Niagara Rosada’ e sua relação com a ocorrência de míldio (*Plasmopara viticola*)**. 2008. 187 f. Tese (Doutorado em Física do Ambiente Agrícola). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

MACHADO, I. P.; SILVA, A. S. DA; OLIVEIRA, C. V. S. **Desenvolvimento de metodologia para dosagem de fenóis sintéticos utilizados em formulações de desinfetantes por CLAE**. Rio de Janeiro, Fiocruz. 2009 Disponível em: <<http://www.sbq.org.br/ranteriores/23/resumos/1301/>>. Acesso em: 02 de maio de 2013.

MACIEL, M.J. **Avaliação do extrato alcoólico de Hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante em alimentos**. 2011. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

MAIA, J.D.G.; CAMARGO, U.A. **Sistema de produção de uvas rústicas para processamento em regiões tropicais do Brasil**. Embrapa Uva e Vinho. Sistema de produção, 9 ISSN 1678-8761 Versão Eletrônica Dez./2005. Disponível em:

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasRusticasParaProcessamento/cultivares.htm>>. Acesso em 24 de janeiro de 2012.

MAJOLO, C. **Atividade antibacteriana “in vitro” de diferentes acessos de urucum (*Bixa orellana* L.) e sua relação com o teor de bixina presente nas sementes.** 2010. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n.4, p. 659-664, 2005.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 24, n. 1, p. 59-82 jan./jun. 2006

MANFROI, V. ; *et al.* Influência de taninos enológicos em diferentes dosagens e épocas distintas de aplicação nas características físico-químicas do vinho Cabernet Sauvignon. **Ciências e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.30 supl.1 Mai. 2010.

MANICA, I.; POMMER, C.V., **Uva: do plantio a produção, pós-colheita e mercado.** Porto Alegre: Cinco continentes, 2006. 185p.

MANOSSO, J. **O Vinho Como Alimento Saudável.** Disponível em <http://www.uvibra.com.br/vinho_alimento_base.pdf>. Acesso em 12/abril de 2008.

MAPA. **Uva.** Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/uva>>. Acesso em 19/março de 2013.

MARDIGAN, L.P.; *et al.* **Compostos fenólicos totais de extrato de uva Isabel e sua ação sobre bactérias ácido-láticas que causam limosidade em salsicha.** Cesumar, Centro Universitário de Maringá. Maringá, VI EPCC, Out. 2009a.

MARDIGAN, L.P.; *et al.* **Estudos preliminares com extrato de uva Isabel sobre bactéria de interesse em alimento.** Cesumar, Centro Universitário de Maringá. Maringá, VI EPCC, Out 2009b.

MARTIN, J.G.P. **Atividade antimicrobiana de produtos naturais: erva-mate e resíduos agroindustriais.** 2011. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de alimentos). Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.

MAZZALA NETO, W. **Agroecologia e processamento de alimentos em assentamentos rurais**. 2009, 121f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2009.

MELLO, L.M.R **Produção e Comercialização de Uvas e Vinhos** - Panorama 2002. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/artigos.html>>. Acesso em 24 jan. 2012.

MELLO, L.M.R **Atuação do Brasil no Mercado Vitivinícola Mundial** - Panorama 2011. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot115.pdf>>. Acesso em 21 jan.2013.

MELLO, L.M.R Vitivinicultura Brasileira - Panorama 2011. **Comunicado Técnico 115**, Março, 2012 Bento Gonçalves, RS Disponível em <www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot115.pdf>. Acesso em: 29 abr. 2013.

MELO, G. W. B.de **Adubação e manejo do solo para a cultura da videira**. 2008. Disponível em:<<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/viticultura/adubvid.html>>. Acesso em: 12 mar. 2012.

MELO, G. W. B.de **Produção orgânica de uva Niágara Rosada**. 2012.Disponível em: <<http://hotsites.sct.embrapa.br/prosarural/programacao/2012/producao-organica-de-uva-niagara-rosada>>. Acesso em 02 de fev. 2013.

MELO, P. S. **Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais**. 2010. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.

MELO, P. S.; *et al.* Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.6, p.1088-1093, jun, 2011.

MENEGETTI, G. A. **Desenvolvimento, sustentabilidade e agricultura familiar**. 2009. Disponível em: <<http://www.emater.tche.br/site/br/arquivos/servicos/biblioteca/digital/art18.pdf>>. Acesso em 04 mar. 2013.

MIELE, A.; MIOLO, A. **O sabor do vinho**. Bento Gonçalves/RS: Vinícola Miolo: Embrapa uva e vinho, 2003.136p.

MOHAMED, J.A.; HUANG, D.B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 56, p. 1581-1588, 2007.

MOURE, A.; *et al.* Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, London, v. 72, p. 145-171, 2001.

MOTTA, I. S. **Calda bordalesa: utilidades e preparo**. Dourados/MS: Embrapa Agropecuária Oeste, 2008. 2p.

MOYER, R.A. *et al.* Anthocyanins, phenolics, and Antioxidants capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v.50, p.519-525, 2002.

MULLINS MG BOUQUET A, WILLIAMS LE. **Biology of grapevine**, Cambridge, Grã- Bretanha: Cambridge University Press, 1992. 239p.

NAVES, E.L.; GARRIDO, L.R.; SÔNEGO, O.R.; KUNH, G.B. **Doenças e seu controle**. Embrapa Uva e Vinho. Sistema de Produção, 9 ISSN 1678-8761. Versão Eletrônica. Dez./2006. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/fonteshtml/uva/uvasrusticasparaprocessamento/doencas.htm>>. Acesso em 25 jan. 2012.

OJEDA, H. Los compuestos fenólicos de la uva. **Información técnica pela industria vitivinícola**. Mendonza, n. 4, ano IV. sept.-oct. 2007.

OLLAT N., *et al.* Grape berry development: A review. **Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin**, Paris, v. 36, n.3, p.109-131, 2002.

PARADELLA TC, KOGA-ITO CY, JORGE AOC. *Enterococcus faecalis*: clinical and microbiological considerations. **Revista de Odontologia da Unesp**, Araraquara, v.36, n.2, p.163-68, 2007.

PASSOS, M.G.; CARVALHO, H.H.; WIEST, J.M. Inibição e Inativação *in vitro* de diferentes métodos de extração de *Ocimum gratissimum* L. (“alfavacão”, “alfavaca”, “alfavaca-cravo”) – *Labiatae* – (Lauriaceae) frente a bactérias de interesse em alimentos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n.1, p.71-78, 2009.

PASSOS, M.G.; CARVALHO, H.H.; WIEST, J.M. Inativação bacteriana e sensorialidade em bebidas formuladas a partir extrato reconstituído de *Ocimum gratissimum* L. (Alfavaca) – *Labiatae* – (Lauriaceae). **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas. v.30, n.2, p. 414-420, abr – jun, 2010.

PHENOL Dicionário Médico Dorland para a saúde dos consumidores. 2007. Disponível em: <<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/phenol>>. Acesso em 02 de mai. 2013.

PINTO, E.P.; MOREIRA, A. S.; MACHADO, M.R.G.; RODRIGUES, R. S. A uva como alimento funcional: uma revisão. **Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**, Bento Gonçalves, n. 3, p. 66-73, 2011.

POMMER, C.V. **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco continentes, 2003. 778p.

PORTUGAL, C. B.; PALACIOS, A. Vale dos vinhedos perfil produtivo de vinícolas familiares e diagnóstico qualitativo, microbiológico e sensorial de vinhos. **Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**, Bento Gonçalves, n. 4, p. 18-27, 2012.

PROTAS, J.F.S. **Uvas Americanas e Híbridas para Processamento em Clima Temperado**. Bento Gonçalves: Cnpuv/Embrapa, Sistema de produção 4, Jul 2003.

PROTAS, J.F.S.; CAMARGO, U. A.; MELO, L. M. R. **A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas**. 2008. Disponível em:

<<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/vitivinicultura/>>. Acesso em: 04 out. 2011.

PROTAS, J.F.S.; CAMARGO, U.A. **Vitivinicultura brasileira – Panorama setorial em 2010**. Bento Gonçalves: IBRAVIN: Embrapa Uva e Vinho, 2010. 108p.

PROZIL, S.O. **Caracterização química do engaço da uva e possíveis aplicações**. 2008. Dissertação (Mestrado). Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2008.

PUUPPONEN-PIMIA, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN-CALDENTY, K.M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 4, p. 494-507, 2001.

REVERS, L.F.; MACHADO, C.A.E. **Identificação varietal e genotipagem** – Serviços oferecidos pelo Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Uva e Vinho. Bento Gonçalves: Cnpuv/Embrapa , 64, dez 2005.

REIS, L. M.; RABELLO, B. R.; ROSS, C.; SANTOS, L. M. R. Avaliação da atividade antimicrobiana de antissépticos e desinfetantes utilizados em um serviço público de saúde. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 64, n.5 sept.-oct. 2011.

REYBROUCK, G. The testing of disinfectants. **International biodeterioration and biodegradation**, Londres, v.41, p.269-272, 1998.

RIBÉREAU-GAYON, P. **The anthocyanins of grapes and wines**. In: MARKAKIS, P. (Ed.) Anthocyanins as food colors. New York: Academic Press, 1982. p. 209-242.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. **Tratado de enología: química del vino, estabilización y tratamientos**, Buenos Aires: Hemisferio Sur, v.2, 2003.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. Red winemaking. In:_. **Handbook of enology**. West Sussex: John Wiley & Sons, 2nd ed. 2006. v. 1: The microbiology of wine and vinifications, chap. 12, p. 327-395.

RITSCHER, P.; CAMARGO, U. A. **O Programa de Melhoramento de Uva e o Segmento de Sucos**. 2007 Disponível em:
<<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos>>. Acesso em 30 jan. 2013.

RIOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: review of the literature. **Journal of Ethnofarmacology**, Lausanne, v. 23, p. 127-149. 1988.

RIZZON, L.A. ; MANFROI, V.; MENEGUZZO, J. **Elaboração de suco de uva na propriedade vitícola**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 1998. 24p.

RIZZON, L.A. ; GASPARIN, A. M. **Sistema de vinho moscatel espumante**. Embrapa Uva e Vinho. Sistema de produção, 17 ISSN 1678-8761 Versão Eletrônica Nov./2008. Disponível em:
<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Vinho/SistemaProducaoVinhoMoscatelEspumante/cultivares.htm>>. Acesso em 24 jan. 2012.

ROCKENBACH, I. I. **Compostos fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante do bagaço da vinificação de uvas tintas (*Vitis vinifera L.* e *Vitis labrusca L.*)**. Florianópolis: UFSC, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

ROCKENBACH, I. I.; *et al.* 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**, Campinas, v. 28, p. 238-244, dez. 2008.

ROTAVA, R.; ZANELLA, I.; SILVA, L.P. Atividade antibacteriana, antioxidante e tanante de subprodutos da uva. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria. v. 39, n.3, May/June 2009.

SALIMENA, A.P.S; SANTOS JR, A.C.; ROSSONI, D.F.; CARDOSO, M.G.; PICCOLI, R.H. **Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro de óleos essenciais sobre *Staphylococcus aureus***. XIX Congresso de pós graduação da UFLA. Lavras, 27 set. – 01 out. 2010.

SANTOS, L. P. **Caracterização química e avaliação da propriedade antioxidante de diferentes variedades de uva**. 2009. 50 f. Dissertação (Mestrado em Química). Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

SANTOS, C.M.T. **Tratamento biológico de efluentes e resíduos orgânicos provenientes da produção de vinhos**. Ciências e Tecnologia do Ambiente. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. 2005. 6f. Disponível em: <<http://www.gforum.tv/board/1603/281165/tratamento-biologico-de-efluentes-e-residuos-provenientes-da-producao-de-vinho.html>> Acesso em 06 fev. 2012.

SAUTTER, C. K. et al. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n.3, p.437-442, jul./set. 2005.

SCHILACCI, D.; VENTURELLA, F.; PLESCIA, F.; Antimicrobial and antiproliferative activity of *peucedanum nebrodense* (Guss.) Strohl **Journal of Ethnofarmacoly**, Lausanne, v. 87, p. 99-101, 2003.

SCHLEIER, R. **Constituintes fitoquímicos de *vitis vinifera* L. (uva)**. Monografia apresentada para obtenção do título de especialista em Fitoterapia no IBEHE/FACIS. Instituto Brasileiro de estudos homeopáticos. São Paulo, 2004.

SCHROEDER, O.B. **Iniciação ao vinho**. Florianópolis: Editora da UFSC, 3 ed.; 1991, 300p.

SHI, X. *ET AL.* **Induction of Apoptosis in Human Leukemia Cells by Grape Seed Extract Occurs via Activation of c-Jun NH2-Terminal Kinase.** 2008. Disponível em: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/15/1/140.abstract>>. Acesso em: 30 mai. 2013.

SHIN, M.O.; YOON S.; MOON J.O. The proanthocyanidins inhibit dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. **Archives of Pharmacal Research**, Suhcho-Ku Seoul, v. 33, n.1, p. 167-73, jan 2010.

SILVA, A.D.F. **Análise de Compostos Fenólicos e Potencial antioxidante de amostras Comerciais de Sucos de Uva e Produtos Derivados de Uvas Vinícolas** 2010. 103 f. Dissertação 2010. Universidade Federal da Paraíba, centro de Tecnologia. João Pessoa, 2010.

SOARES, M.; *et al.* Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1. Mar, 2008.

SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 30, p. 91-113, 1997.

SOUQUET, J. M.; LABARBE, B.; LE GUERNEVÉ, C.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Phenolic Composition of Grape Stems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, 1076-1080, 2000.

SOUZA, A.A.; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana de *Aloysia gratissima* (Gill *et* Hook) Tronc. (garupá, erva-santa), usada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul – Brasil. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, Botucatu, v.9, n.3, p. 23-29, 2007.

SOUZA, C.A.S.; AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M. Atividade antimicrobiana de *Taegetes miniuta* L.- *Compositae* (Chinchillho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 37, p. 429-433, 2000.

SOUZA, F.A.; **Finalidades**, IFRS Bento Gonçalves, 2002a. Disponível em : <<http://www.bento.ifrs.edu.br/site/midias/arquivos/relatorio20010.pdf>> Acesso em 21 jan. 2013.

SOUZA, J.S.I. **Viticultura brasileira: principais variedades e suas características.** FEALQ, Piracicaba, v. 9, 2002b. 368p.

SOUZA, J.; S. I.; MARTINS, F. P. **Viticultura Brasileira: Principais Variedades e suas Características**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 368p.

SOUZA, V. B. **Aproveitamento dos subprodutos de vinificação da uva Bordô (vitis labrusca) para obtenção de pigmentos com propriedades funcionais**. 2013. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Zootecnia e engenharia de alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

SOUZA V. C.; LORENZI H. **Botânica Sistemática - Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Plantarum, Nova Odessa, 2005.

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C. E OLIVEIRA, F. A.. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 55, n. 4, p. 297-304, 2008.

TIMM, J. R. T.; SPADA, P.; DANI, C. Conteúdo fenólico, perfil físico-químico e determinação da atividade antioxidante de vinhos tintos finos da variedade Tannat provenientes do Brasil e do Uruguai. **Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**, Bento Gonçalves, n. 4, p. 46-54, 2012.

TOMASSET, L. U. **Química enológica**. Madrid: Ediciones mundi-prensa, 1998. 400p.

TORRES, J. L.; VARELA, B.; GARCÍA, M. T.; CARILLA, J.; MATITO, C.; CENTELLES, J. J.; CASCANTE, M.; SORT, X.; BOBET, R. Valorization of grape (Vitis vinifera) byproducts: antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 7548-7555, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. São Paulo: Artmed Cap. 7, p. 186 a 209. 10ª edição, 2012.

TRIOLI, G.; HOFMANN, U. ORWINE: **Código de buenas prácticas vitivinícolas ecológicas**. 2009. 244p. Editado por: Hofmann U. ECOVIN- Asociación Federal de productores de vino ecológico, Wormserstrasse 162; 55276 Oppenheim-Alemania y.

VIGARA, J. J. M.; AMORES, R. A. P. **Química enológica**. Madrid: A. Madrid Vicent. 65-93. 2010.

VINHOS do mundo todo. Rio de Janeiro: Jorge Zahar- 3ª ed. 2008, 688 p.

VINSON, J.A., SU X., ZUBIK, L., BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.49, n.11, p. 5315-5321, 2001.

VIT, F. F. **Análise bromatológica de farinha de engaço, bagaço e semente de uva orgânica.** XVII Encontro de jovens Pesquisadores da UCS Set 2009 – Instituto de Biotecnologia UCS, Caxias do Sul.

WALKER A. R.; *et al.* Uvas brancas surgiu por meio da mutação dos dois genes reguladores semelhantes e adjacentes. **Planta Journal**, Bethesda, v. 49, n. 5, p. 772-85, mar. 2007

WEAVER, R. **Grape growing**, New York: J. Wiley, 1976. 371p.

WIEST, J.M.; CARVALHO, H.H.; AVANCINI, C.A.M.; GONÇALVES, A.R. Atividade anti-estafilócica em extratos de plantas com indicativo medicinal ou condimentar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v.11, n.2, p.209-215, 2009a.

WIEST, J.M.; CARVALHO, H.H. Inibição e inativação *in vitro* de *Salmonella* spp. com extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.61, n.1, p. 119-127, 2009b.

WIEST, J.M.; Inibição e inativação de *Escherichia coli* por extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 1-7, jul-set, 2009c.

ZOECKLEIN, B.W.; FUGELSANG, K.C.; GUMP, B.H.; NURY,F.S. **Análisis y producción de vino.** Zaragoza: Acribia. 2001, 613p.

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

APÊNDICES

ARTIGO 1 *

***Submetido a Revista Ciência Rural**

Santa Maria – RS

Manuscrito ID: CR – 2013 – 0862 Data de submissão: 25 de junho de 2013

**Extratos etanólicos de engaço de uva na perspectiva da desinfecção aplicados à
produção animal e à agroindústria familiar**

*Ethanol extracts of grape stalks towards disinfection applied to animal production
and family agroindustry*

Raquel Teresinha Czamanski^{2*} Heloisa Helena Chaves Carvalho³

José Maria Wiest⁴

RESUMO

Considerando-se a importância da busca de alternativas à destinação de resíduos da viticultura, com ênfase no engaço, determinou-se a atividade antibacteriana de extratos etanólicos (alcoholatura/planta *in natura* e hidroalcoholatura/planta seca) na perspectiva de sua aplicação como produtos desinfetantes em situações-problema específicos em produção animal, bem como em situações de agregação de valor à matéria-prima desta natureza, em sistemas de agroindústria familiar ou de pequeno porte. Através de testes de diluição em sistema de tubos múltiplos, obteve-se a intensidade da atividade de inibição bacteriana (IINIB/Bacteriostasia) e a intensidade da atividade de inativação bacteriana (IINAB/Bactericidia) de extratos etanólicos de engaço das uvas (*Vitis L.*) cultivares ‘Bordô’, ‘Isabel’ e ‘Moscatto’. Paralelamente, o teor de polifenóis totais foi quantificado utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. Houve diferença significativa entre os cultivares analisados: o extrato etanólico (alcoholatura) de engaço do cultivar ‘Bordô’ foi significativamente superior aos demais,

I* III Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: raquel.czamanski@bento.ifrs.edu.br. Autor para correspondência.

II III Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

sugerindo uma relação direta entre a concentração de polifenóis totais e a atividade antibacteriana encontrada. A pesquisa demonstrou que o extrato etanólico de engaço dos cultivares testados apresenta grande potencial como fonte de fenóis para produtos desinfetantes a serem utilizados na produção animal e/ou agroindústria familiar.

Palavras-chave: Resíduos da vinificação, engaço, atividade antibacteriana, compostos fenólicos.

ABSTRACT

Considering the importance of searching alternatives for disposal of viticulture residues, focused on grape stalks, the antibacterial activity of ethanolic extracts (alcoholature/fresh plant and hidroalcoholature/dry plant) has been determined aiming at their application as disinfectants in specific problem-situations of animal production as well as in situations of adding value to the raw material of this nature in both family agroindustry or small business systems. By testing the dilution in multiple tube systems, the intensity of bacterial inhibition activity (IINIB/Bacteriostasia) and the intensity of bacterial inactivation (IINAB/Bactericidia) of ethanolic extracts from grape (Vitis L.) stalks, cultivars 'Bordô', 'Isabel' and 'Moscatto', have been obtained. Simultaneously, the content of total polyphenols have been measured by using Folin-Ciocalteu reagent. Significant differences among those cultivars could be observed. The ethanolic extract (alcoholature) from the grape stalk of the cultivar 'Bordô' has been significantly higher than the others, suggesting a direct relationship between the concentration of phenolic compounds and the antibacterial activity. The research has showed that the ethanolic extract from grape stalks of those cultivars has great potential as a source of phenols for disinfectant products to be used in animal production and/or family agroindustry.

Key-words: residues of viticulture, grape stalk, antibacterial activity, phenolic compounds

INTRODUÇÃO

A viticultura tem grande importância socioeconômica para o Brasil, destacando-se a geração de empregos em grandes empreendimentos que produzem uvas de mesa e para processamento, atividades ligadas ao turismo e, principalmente, à sustentabilidade da pequena propriedade (MELLO, 2011).

No Rio Grande do Sul, a Serra Gaúcha é a principal região produtora, sendo desenvolvida tipicamente pela agricultura familiar e envolvendo atualmente mais de onze mil propriedades vitícolas (PORTUGAL e PALACIOS, 2012).

Descobertas científicas publicadas nos últimos anos promovem o consumo contínuo e moderado do vinho para a prevenção de determinadas doenças. A ação antioxidante do resveratrol, um polifenol presente no vinho, auxilia no tratamento de doenças cardiovasculares e no combate ao excesso de colesterol. De comprovado efeito bactericida e antiviral, estimula o apetite, facilita a digestão e retarda o envelhecimento celular e orgânico, além de auxiliar na prevenção do câncer (SAUTTER *et al.*, 2005; GUERRA, 2010).

Entretanto, os resíduos gerados na atividade vitivinícola, por sua quantidade, se não forem devidamente tratados, podem causar severas consequências ao meio-ambiente, poluindo o solo e contaminando as fontes de água (DA SILVA, 2003).

A uva é fonte de diversos compostos fenólicos em elevadas concentrações, e os subprodutos da vinificação, em sua maioria, podem manter quantidades consideráveis dessas substâncias, como os flavonóides (antocianinas, proantocianidinas e taninos) e os não falvonóides: os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos

hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos). Quimicamente, os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (ROCKENBACH, 2008; DE OLIVEIRA, 2010).

Segundo DA SILVA (2003), *engaços* são as matérias-primas mais pobres e de valorização mais simples. Quando separados por desengaçadeira, representam cerca de 3,5% a 4,5% da massa total da vindima e 30% de seu volume (MELO *et al.*, 2011). São constituídos por cerca de 50% de umidade; na matéria seca predomina a celulose (30%-40%), seguida pela lenhina e, em menor quantidade, material tartárico. A composição do engaço o torna impróprio para alimentação do gado. Seu aproveitamento pode se dar como base de um “composto”, matéria-prima para a indústria do papel, devido ao seu elevado teor celulósico, de adubo orgânico e de combustível. O poder calorífico do engaço é da ordem de 2000 a 2500 calorias/kg, o que torna seu aproveitamento como combustível absolutamente viável (DA SILVA, 2003).

Objetivou-se com esta pesquisa a determinação da atividade antibacteriana de extratos etanólicos (alcoholaturas/planta *in natura* e hidroalcoholaturas/planta seca) de engaço de uva (*Vitis L.*) na perspectiva de sua aplicação como produtos desinfetantes em situações-problema específicos em produção animal, bem como em situações de agregação de valor à matéria-prima desta origem, em sistema de agroindústria familiar ou de pequeno porte.

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras foram coletadas durante os meses de fevereiro e março na safra de 2011. Após o desengace da uva na vinícola Mena Kaho, localizada na Linha Eulália, em Bento Gonçalves/RS, obtiveram-se os engaços e cascas dos cultivares ‘Bordô’ e

‘Isabel’; as folhas, após a colheita. Na propriedade da família Strapazzon, localizada na Linha São Pedro, em Bento Gonçalves/RS, foram coletadas as amostras do cultivar ‘Moscato’.

Para o preparo de alcoolaturas, utilizaram-se vidros esterilizados com tampa na seguinte proporção: 400 gramas da amostra *in natura* em um litro de álcool etílico de cereal a 96°GL (Farmaquímica, Porto Alegre/RS/BR), de acordo com a Farmacopeia (BRASIL, 1959; 2010). Para as hidroalcoolaturas, utilizaram-se amostras secas em estufa a 40°C com ventilação forçada, até pesagem constante, na seguinte proporção: 100 gramas da amostra seca em um litro de álcool etílico de cereal a 70°GL (Farmaquímica, Porto Alegre/RS/BR), de acordo com a Farmacopeia (BRASIL, 1959; 2010).

Após um período mínimo de quinze dias, as alcoolaturas e hidroalcoolaturas foram filtradas com papel de filtro esterilizado e submetidas à destilação fracionada sob pressão reduzida em aparelho evaporador rotatório. A quantidade de álcool a ser retirado foi calculada segundo a Farmacopeia (BRASIL 1959; 2010), sendo a porção alcoólica desprezada e o extrato daí obtido, vertido em vidro estéril para a realização das análises.

As amostras de inóculos-padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) utilizadas foram duas bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis*, ATCC 19433) e duas bactérias Gram-negativas (*Salmonella* Enteritidis, ATCC 13076 e *Escherichia coli*, ATCC 11229).

Foram realizadas diluições seriais logarítmicas seguindo a técnica de diluição serial de tubos múltiplos (AVANCINI & WIEST, 2008) a partir do inóculo inicial, transferindo-se asépticamente 1ml deste para tubos de ensaio contendo 9ml de água

peptonada estéril a 0,1% para obter a diluição 10^{-1} , e assim sucessivamente até a diluição 10^{-8} .

Fez-se a média aritmética das Unidades Formadoras de Colônias na diluição 10^{-7} > 10 UFC/mL, e na diluição $10^{-8} \geq 1$ UFC/mL, segundo CAVALLI-SFORZA (1974).

A verificação da atividade antibacteriana foi determinada segundo Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft / Sociedade Alemã de Medicina Veterinária, DVG, (1981). Foram preparadas quatro placas de Petri subdivididas em oito partes iguais contendo ágar nutriente (Nutrient Agar, ACUMEDIA®, Maryland/Baltimore/USA) para a linha sem desinibidor e quatro placas para a linha com os desinibidores. As placas semeadas foram colocadas invertidas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas de incubação aeróbia. No dia seguinte procedeu-se à leitura e contagem das UFC/mL e a novas semeaduras em novas placas para se prosseguir com as leituras de 48, 72 e 144 horas.

Os resultados obtidos foram lidos como intensidade de atividade de inibição bacteriana (IINIB) e intensidade de atividade de inativação bacteriana (IINAB). Segundo DVG (1981) e REYBROUCK (1998), entende-se por IINIB/Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia o resultado do confronto da bactéria com a solução antibacteriana em meio de cultura específico BHI (Brain Heart Infusion Oxoid®) e por IINAB/Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia o mesmo resultado, porém sob a influência dos desinibidores bacterianos acrescentados ao meio (Polisorbato/Tween 80 - REAÇÃO QUÍMICA®, Porto Alegre/RS/BR, a 6%; L-histidina - LABSYBTH®, Diadema, SP/BR a 0,2% e Lecitina de soja HERBARIUM®, Colombo, PR/BR a 0,6%).

IINIB e IINAB foram representados por variáveis ordinais arbitrárias, que assumiram valores de um (1) a nove (9). O valor 9 representando atividade máxima e o valor 1, ausência de atividade, conforme legenda da Tabela 2.

O teste de suspensão baseou-se nas orientações de DVG (1981), RIOS *et al.* (1988), REYBROUCK (1998) e constou das seguintes etapas: teste de suspensão simples e teste de suspensão simulando condições práticas de uso, com matéria orgânica.

A extração de polifenóis foi feita segundo a metodologia de VINSON *et al.* (2001), e o teor de polifenóis totais foi determinado pelo método de Folin e Ciocalteu, com as modificações sugeridas por KAROU *et al.* (2005).

Foram realizadas análises estatísticas: Análises de Variância Fatorial (Anova) para as variáveis “respostas valor de IINIB e valor de IINAB” através do Proc GLM do Programa SAS; Testes de Comparações Múltiplas de Tukey, para comparar as médias de cultivares, tipos de bactérias e concentrações dos extratos. As análises de Variância (Anova) de medidas repetidas (tempo de exposição) para a variável “resposta valor de IINAB” foram realizadas através do Proc Mixed do Programa SAS. As correlações entre “respostas valores de IINIB e de IINAB” com Compostos Fenólicos foram realizadas através das análises de Correlação Linear de Pearson, via Programa SPSS. Análises de Variância Não-Paramétrica de Kreuskal-Wallis foram utilizadas para as variáveis “respostas valor de IINAB e valor de IINIB” com o fator matéria orgânica (20%: leite integral e albumina sérica bovina - BSA - Diamed®).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato etanólico (alcoholatura) de engaço do cultivar ‘Bordô’ a 50% foi considerado o melhor resultado (valor de IINIB e IINAB máximo, 9) para todas as bactérias e para maior quantidade de polifenóis totais (mg equivalentes de ácido gálico.100g-1 de amostra) encontrados. Este tratamento, portanto, foi selecionado para a realização do teste de suspensão (tempo de exposição e presença de matéria orgânica).

Os resultados dos polifenóis totais e quantitativos da atividade antibacteriana, IINIB e IINAB, dos extratos etanólicos e hidroetanólicos dos diferentes cultivares encontram-se nas Tabelas 1 e 2.

No teste de suspensão com extrato etanólico (alcoholatura) de engaço do cultivar ‘Bordô’ a 50%, em trinta minutos de ação, observou-se a inativação de todas as quatro bactérias testadas. O resultado do teste de suspensão simulando sujidades em agroindústria encontra-se na Tabela 3.

Através da Análise de Variância, foi possível concluir que o efeito de “Cultivar, Tipos de Método de Extração, Bactéria e Concentração” é significativo: $p < 0,0001$ para todos os fatores em relação às variáveis “respostas valores de IINIB e IINAB”.

Através do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, foi possível concluir que os valores médios de IINIB e IINAB do Cultivar ‘Bordô’ diferem significativamente do valor médio de IINIB e IINAB das Cultivares ‘Isabel’ e ‘Moscato’, respectivamente, $p < 0,0001$ e $p < 0,0001$.

Através da Análise de Variância, foi possível concluir que o efeito da interação “Cultivar e tipos de Métodos de Extração é significativo, $p < 0,0001$ em relação à variável “resposta Compostos Fenólicos”

Através do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, foi possível concluir que dentro dos Tipos de Métodos de Extração, a média de Compostos Fenólicos do

Cultivar ‘Bordô’ difere significativamente da média de Compostos Fenólicos dos demais Cultivares, $p < 0,0001$.

Através da Análise de Variância Não-Paramétrica de Kruskal-Wallis, foi possível concluir que existe diferença significativa entre os *ranks* médios dos valores de IINAB do Fator Matorg-Bact (combinação de Material Orgânico e Bactéria): $p < 0,0001$.

Através da Análise de Variância, foi possível concluir que o efeito de “Bactéria e Tempo de Exposição” é significativo: $p = 0,0311$ e $p < 0,0001$, respectivamente, em relação à variável “resposta valor de IINAB”.

É interessante destacar também que, em todas as análises de atividade antibacteriana (IINAB) realizadas, as leituras de 48, 72 e 144 horas não sofreram alteração; portanto, a variável “tempo de leitura” não foi considerada para fins estatísticos.

Os teores de polifenóis totais encontrados na pesquisa variaram de acordo com o tipo de extração etanólica (alcoholatura ou hidroalcoholatura) e com os cultivares utilizados.

Na pesquisa realizada por ABE *et al.* (2007), o conteúdo de fenólicos totais, determinado através do método de Folin-Ciocalteu, variou significativamente entre 65 ± 1 e 390 ± 30 mg equivalentes de ácido gálico.100g-1 de amostra base úmida. FREITAS (2006) verificou que a safra 2004 continha mais polifenóis do que a safra 2003 devido à menor precipitação pluvial, maior insolação e menor umidade relativa do ar, condições favoráveis à maturação fenólica das uvas. Variações no perfil de compostos fenólicos além de produzir uvas com sabores e cores variadas podem resultar em diferentes respostas biológicas e que, apesar de apresentarem alguns constituintes

em potencial, outros compostos podem estar agindo sinergeticamente, contribuindo para os efeitos benéficos (FREITAS 2006; ABE *et al.* 2007).

CONCLUSÃO

A relação entre os teores de polifenóis totais e a atividade antibacteriana determinada pela análise de Correlação Linear de Pearson, demonstrou que existe correlação positiva entre “valores de IINIB e IINAB” e os “valores dos Compostos Fenólicos” ($p < 0,0001$), ou seja, à medida que os valores dos Compostos Fenólicos aumentam, os valores de IINIB e IINAB também aumentam.

Desta forma, utilizar extratos etanólicos de resíduos da viticultura, em especial o extrato etanólico de engaço como desinfetante na produção animal e na agroindústria familiar de produtos de origem animal, é viável, desde que anteriormente se faça a remoção da matéria orgânica local, conforme demonstrado na Tabela 3 (teste de suspensão com matéria orgânica a 20%, representada por leite integral e albumina sérica bovina).

REFERÊNCIAS

ABE, L.T. *et al.* Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v. 27, n. 2, p. 394-400, abr.-jun. 2007.

AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M. Atividade desinfetante do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. e Schlecht.- Gutiferae ("escadinha"/"sinapismo"), frente a diferentes doses infectantes de *Staphylococcus aureus* (agente infeccioso em mastite bovina). **Rev. Bras. Plantas Med.**, v.10, n.1, p.64-9, 2008.

BRASIL. **Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil**. 2. ed., São Paulo: Siqueira, 1959.

BRASIL. Anvisa/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, Brasília, v. 2, 2010. 546p.

CAVALLI-SFORZA, L. **Biometrie: Grundzüge biologisch-medizinische Statistic (Biometria: fundamentos de estatística virológica-médica)**. Stuttgart: Gustav Fisher V. 1974. p.201-204.

DA SILVA, L.M.L.R. **Caracterização dos subprodutos da vinificação**. Millenium, Viseu, v. 28, p. 123-133, out., 2003.

DE OLIVEIRA, D. A. **Caracterização fitoquímica e biológica de extratos obtidos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) das variedades Merlot e Syrah**. 2010. 211 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Centro Tecnológico. Curso de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina.

DVG (DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT - Sociedade Alemã de Medicina Veterinária). **Richtlinien zur Prüfung Chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin**. In: SCHLIESSER, T.; STRAUCH, D. Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft. Stuttgart: Enke Verlag. p. 47-55, 1981.

FREITAS, D. M. DE. **Variação dos compostos fenólicos e de cor dos vinhos de uvas (*Vitis vinifera*) tintas em diferentes ambientes.** 2006, 42 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria.

GUERRA, C.G. Vinho tinto. In: Venturini Filho, W. G. **Bebidas alcoólicas: Ciência e tecnologia.** São Paulo: Edgard Blücher, 2010. cap. 11, p. 209-233.

KAROU D., DICKO M.H., SIMPORE J., TRAORE A.S. Antioxidant and Antibacterial Activities of Polyphenols from Ethnomedicinal Plants of Burkina Faso. **Afr. J. Biotechnol.**, v.4, n.8, p.823-828, 2005.

MELLO, L.M.R **Vitivinicultura Brasileira - Panorama 2011.** Comunicado Técnico 115, março 2012, Bento Gonçalves, RS, disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot115.pdf>>. Acesso em 21 jan.2013.

MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K.B.; TIVERON, A. P. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 6, p.1088-1093, jun. 2011.

PORTUGAL, C. B.; PALACIOS, A. Vale dos Vinhedos: perfil produtivo de vinícolas familiares e diagnóstico qualitativo, microbiológico e sensorial de vinhos. **Rev. Bras. Vitic. Enol.**, n. 4, p. 18-27, 2012.

REYBROUCK, G. The testing of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 41, p. 269-71, 1998.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening Methods for Natural Products with Antimicrobial Activity; Review of the Literature. **J. Ethnofarmacol.**, v. 23, p. 127-149, 1988.

ROCKENBACH, I. I. *et al.* Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades *Tannat* e *Ancelota*; **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 28 (Supl.): 238-244, dez. 2008.

SAUTTER, C. K. *et al.* Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.25, n. 3, p. 437-442, jul.-set. 2005.

VINSON, J.A., SU X., ZUBIK, L., BOSE, P. Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Fruits. **J. Agr. Food Chem.**, v. 49, n. 11, p. 5315-5321, 2001.

Tabela 1: Polifenóis totais dos extratos etanólicos de engaçó de três cultivares de uva - Safra 2011, Bento Gonçalves – RS (média de três repetições)

EXTRATO ETANÓLICO				EXTRATO HIDROETANÓLICO			
		Média	Desvio			Média	Desvio
Cultivares	Conc. (mgGAE/100g)		Padrão	Cultivares	Conc. (mgGAE/100g)		Padrão
'Bordô'	100%	477	$\pm 1,77$	'Bordô'	100%	159,80	$\pm 0,52$
'Isabel'	100%	325,56	$\pm 1,40$	'Isabel'	100%	97	$\pm 1,41$
'Moscato'	100%	246,66	$\pm 1,52$	'Moscato'	100%	59,80	$\pm 1,65$

(mg equivalentes de Ácido Gálico.100g⁻¹ de amostra)

Tabela 2: Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB - ausência de desinibidores bacterianos) e Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB - presença de desinibidores bacterianos) de Extrato Etanólico e Hidroetanólico de Engaço de Uva dos Cultivares: **B** ('Bordô'), **I** ('Isabel'), **M** ('Moscatô') em suas concentrações, contra quatro Bactérias.

ALCOOLATURA														
Inóculos		<i>S. aureus</i>			<i>E. faecalis</i>			<i>S. Enteritidis</i>			<i>E. Coli</i>			
Conc.	Cultivares	Atividade	B	I	M	B	I	M	B	I	M	B	I	M
			IINIB	9	9	8	9	9	9	9	9	9	9	9
		IINAB	9	9	8	9	9	9	9	9	9	9	9	9
	40%	IINIB	8	8	7	9	9	8	9	9	8	9	9	8
		IINAB	8	8	7	9	8	7	9	9	8	9	9	8
	30%	IINIB	7	6	5	8	8	6	8	8	7	8	8	6
		IINAB	6	5	4	8	7	6	8	8	7	8	8	6
	20%	IINIB	5	4	1	7	7	1	7	7	6	7	7	6
		IINAB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

HIDROALCOOLATURA															
Inóculos		<i>S. aureus</i>			<i>E. faecalis</i>			<i>S. Enteritidis</i>			<i>E. Coli</i>				
Conc.	Cultivares	Atividade	B	I	M	B	I	M	B	I	M	B	I	M	
			IINIB	7	5	4	8	6	5	8	6	5	8	6	5
		IINAB	6	5	4	8	6	5	8	6	5	8	6	5	
	40%	IINIB	6	5	3	7	6	3	7	6	3	7	6	3	
		IINAB	6	5	1	7	6	3	7	6	3	7	6	3	
	30%	IINIB	3	4	1	5	6	2	6	6	3	6	4	3	
		IINAB	2	2	1	5	5	2	6	4	3	6	4	2	
	20%	IINIB	1	1	1	2	2	1	3	2	1	3	2	1	
		IINAB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

Legenda: IINIB = bacteriostasia - IINAB = bactericidia - na = nenhuma atividade

UFC/mL = Unidade Formadora de Colônia por mililitro

9 8 7 6 5 4 3 2 1 Variáveis ordinais de IINIB/IINAB
 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} 10^{-8} = Diluições do inóculo (UFC/mL)
 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3 10^2 10^1 10^0 **na** = Doses infectantes (UFC/mL) inibidas/inativadas

Tabela 3: Teste de Suspensão com matéria orgânica - Extrato etanólico de engaço de uva ‘Bordô’ com 20% de leite integral e 20% de albumina sérica bovina, média de três repetições.

leite integral				albumina sérica bovina			
TEMPO	BACTÉRIA	IINIB	IINAB	TEMPO	BACTÉRIA	IINIB	IINAB
30 MIN	<i>Staphylococcus aureus</i>	6	5	30 MIN	<i>Staphylococcus aureus</i>	5	2
	<i>Salmonella</i> Enteritidis	8	8		<i>Salmonella</i> Enteritidis	7	4
60 MIN	<i>Staphylococcus aureus</i>	7	6	60 MIN	<i>Staphylococcus aureus</i>	6	6
	<i>Salmonella</i> Enteritidis	9	8		<i>Salmonella</i> Enteritidis	8	7

APÊNDICES

ARTIGO 2*

***Submetido a Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**

Belo Horizonte – MG

REG.: 6987/2013 - Protocolado em: 26/06/2013

Atividade antibacteriana de extratos etanólicos de resíduos da viticultura na perspectiva da desinfecção aplicados à produção animal e agroindústria familiar

CZAMANSKI, R.T. 1*; CARVALHO, H.H.C 2; SILVA, S.P. 3; VIEIRA, A.C. 2;
WIEST, J.M. 1,2

* Correspondência: R.T.Czamanski – IFRS *Campus* Bento Gonçalves, Av. Osvaldo Aranha, 540, CEP 95700-000, Bento Gonçalves – RS/Brasil. E-mail:
raquel.czamanski@bento.ifrs.edu.br

1 Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

2 Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

3 Bolsista Sigproj – Acadêmica IFRS – *Campus* Bento Gonçalves, RS/Brasil.

Resumo

Através de testes de diluição em sistema de tubos múltiplos, determinou-se a intensidade de atividade de inibição bacteriana (IINIB/Bacteriostasia) e a intensidade de atividade de inativação bacteriana (IINAB/Bactericidia) de extratos etanólicos (alcoholatura/ planta *in natura* e hidroalcoholatura/planta seca) de engaço, casca e folha de videiras (*Vitis* L.) de três cultivares diferentes: ‘Bordô’, ‘Isabel’ e ‘Moscatto’. Realizaram-se testes de decocto com os resíduos dos cultivares selecionados; porém, este método de extração dos princípios ativos não apresentou nenhuma atividade antibacteriana. Os inóculos bacterianos padronizados de interesse veterinário foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 11229) e *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076). Paralelamente, o teor de polifenóis totais e de antocianinas dos extratos dos diferentes resíduos foi quantificado. A atividade antibacteriana do extrato etanólico (alcoholatura) de engaço do cultivar ‘Bordô’ foi superior aos demais. Houve diferença significativa entre os cultivares analisados e o tipo de resíduos. As bactérias Gram-negativas foram mais sensíveis, enquanto a bactéria mais resistente foi a *Staphylococcus aureus*, independentemente dos resíduos utilizados. A determinação de polifenóis totais foi

realizada utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. Em relação ao teor de compostos fenólicos, o extrato etanólico do cultivar 'Bordô' foi significativamente superior, sugerindo uma relação direta entre a concentração de polifenóis totais e a atividade antibacteriana encontrada. As antocianinas foram determinadas utilizando-se o método da diferença de pH, sendo encontradas somente nas cascas, exceto para o cultivar 'Moscatto'. Resíduos da viticultura, em especial o engaço, mostraram grande potencial como fonte de fenóis para produtos desinfetantes, na perspectiva de utilização na produção animal e/ou agroindústria familiar.

Palavras-chave: resíduos da viticultura, engaço, atividade antibacteriana, compostos fenólicos, antocianinas.

Antibacterial activity of ethanolic extracts from viticulture residues towards disinfection applied to animal production and family agroindustry

Abstract

The intensity of bacterial inhibition activity (IINIB/Bacteriostasia) and intensity of bacterial inactivation (IINAB/Bactericidia) of ethanolic extracts (alcoholature/fresh plant and hidroalcoholature / dry plant) from stalks, barks and leaves of vines (Vitis L.) of three different cultivars: 'Bordô', 'Isabel' and 'Moscatto' have been determined through dilution test in multiple-tubes system. Decoction tests have been made with residues of the selected cultivars, but this method of extraction of active principles has showed no antibacterial activity. The standardized bacterial inocula with veterinary interest were: Staphylococcus aureus (ATCC 25923), Enterococcus faecalis (ATCC 19433), Escherichia coli (ATCC 11229) and Salmonella Enteritidis (ATCC 13076). Simultaneously, the content total polyphenols and anthocyanins extracts of different residues have been quantified. The antibacterial activity of ethanolic extract (alcoholature) from stalks of the cultivar 'Bordô' has been superior to the others. There have been significant differences between the cultivars analyzed and the type of residues. Gram-negative bacteria have been more sensitive, while the most resistant bacteria have been Staphylococcus aureus for any residues used. The total polyphenols

has been determined by using the Folin-Ciocalteu reagent. Regarding the content of phenolic compounds, the ethanolic extract from the cultivar 'Bordô' was significantly higher, suggesting a direct relationship between the concentration of phenolic compounds and the antibacterial activity found. Anthocyanins were determined through the method of difference in pH, and have been found only at barks, except for the cultivar 'Moscato'. Viticulture residues, particularly grape stalk, have showed great potential as a source of phenols for disinfectant products to be used in animal production and / or family agroindustry.

Key- words: *viticulture residues, grape stalk, antibacterial activity, phenolic compounds, anthocyanins.*

Introdução

A importância socioeconômica da viticultura para o Brasil, além da geração de empregos em grandes empreendimentos que produzem uvas de mesa e para processamento, reside nas atividades ligadas ao turismo e na sustentabilidade da pequena propriedade (Mello, 2011).

No Rio Grande do Sul, a Serra Gaúcha é a principal região produtora, sendo desenvolvida tipicamente pela agricultura familiar e envolvendo atualmente mais de onze mil propriedades vitícolas (Portugal e Palacios, 2012).

A uva é fonte de diversos compostos fenólicos em elevadas concentrações, e os subprodutos da vinificação, em sua maioria, mantêm quantidades consideráveis de substâncias como os flavonóides (antocianinas, flavanóis e flavonóis), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos) e os taninos (Abe, 2007; De Oliveira, 2010).

Os resíduos gerados pelas vinícolas destacam-se por serem ricas fontes de compostos fenólicos e pela expressiva quantidade resultante do processamento: a soma do bagaço (cascas e sementes), engaço e borra do processo fermentativo representa, em média, 30% do volume de uvas utilizadas para a produção vinícola (Melo *et al.*, 2011). Engaços são as matérias-primas mais pobres e de valorização mais simples; quando separados por desengaçadeiras, constituem cerca de 3,5% a 4,5% da massa total da vindima (Da Silva, 2003; Melo *et al.*, 2011).

Nos últimos anos os polifenóis dos vinhos têm despertado interesse crescente devido a suas propriedades antioxidantes e seus potenciais efeitos benéficos à saúde (Ojeda, 2007). A atividade antioxidante do resveratrol presente no vinho, por exemplo, auxilia no tratamento de doenças cardiovasculares e no combate ao acúmulo de colesterol, tem comprovada ação bactericida e antiviral, estimula o apetite, facilita a digestão e retarda o envelhecimento celular e orgânico, além de atuar contra o câncer (Sautter *et al.*, 2005; Guerra, 2010).

Vários estudos têm demonstrado que o suco de uva e o vinho contêm compostos fenólicos em quantidades consideráveis e, portanto, seu consumo é desejável como aporte de substâncias antioxidantes naturais. O suco de uva como fonte de compostos fenólicos pode apresentar vantagem com relação ao vinho, já que a ausência de álcool permite seu amplo consumo, inclusive por pessoas portadoras de algumas enfermidades ou com restrições de ordem filosófica, cultural ou religiosa (Malacribia e Motta, 2005; Pinto *et al.*, 2011).

Considerando-se a importância da busca de alternativas à destinação de resíduos da viticultura, determinou-se a atividade antibacteriana de extratos etanólicos (alcoólicos e hidroalcoólicos) de casca, folha e engaço na perspectiva de sua aplicação como produtos desinfetantes em situações-problema específicos em produção animal, bem como em situações de agregação de valor à matéria-prima desta natureza, em sistema de agroindústria familiar ou de pequeno porte.

Material e Métodos

As amostras, resíduos de uva em cultivo orgânico, foram coletadas durante os meses de fevereiro e março na safra de 2011. Após o desengace da uva na vinícola, obteve-se o engaço; a casca, após a prensagem do bagaço, sem fermentação. As folhas foram coletadas após a colheita da uva. Na Vinícola Mena Kaho, localizada na Linha Eulália, em Bento Gonçalves/RS, obtiveram-se os resíduos dos cultivares ‘Bordô’ e ‘Isabel’, e na propriedade da família Strapazzon, localizada na Linha São Pedro, em Bento Gonçalves/RS, os resíduos do cultivar ‘Moscato’.

Para o preparo de alcoolaturas, utilizaram-se vidros esterilizados com tampa na seguinte proporção: 400 gramas da amostra *in natura* em 1 litro de álcool etílico de cereal a 96°GL (Farmaquímica, Porto Alegre/RS/BR), de acordo com a Farmacopéia (Brasil, 1959; 2010). Para o preparo de hidroalcoolaturas utilizaram-se amostras secas

em estufa a 40°C com ventilação forçada, até pesagem constante. As amostras foram picadas e colocadas em vidros esterilizados com tampa na seguinte proporção: 100 gramas da amostra seca em 1 litro de álcool etílico de cereal a 70°GL (Farmaquímica, Porto Alegre/RS/BR), de acordo com a Farmacopéia (Brasil, 1959; 2010). Para o preparo de decocto, utilizaram-se também amostras secas em estufa a 40°C com ventilação forçada, até pesagem constante. As amostras foram picadas e colocadas em envelopes de papel pardo até o momento de serem analisadas, na seguinte proporção: 100 gramas da amostra seca em 1 litro de água destilada de acordo com a Farmacopéia (Brasil, 1959; 2010).

As amostras de inóculos-padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) utilizadas foram duas bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923, e *Enterococcus faecalis*, ATCC 19433), e duas bactérias Gram-negativas (*Salmonella* Enteritidis, ATCC 13076, e *Escherichia coli*, ATCC 11229).

Foram realizadas diluições seriais logarítmicas do inóculo, seguindo a Técnica de Diluição Serial de Tubos Múltiplos (Avancini e Wiest, 2008). A partir do inóculo inicial, transferiu-se assepticamente 1ml deste para tubos de ensaio contendo 9 ml de água peptonada estéril a 0,1% para obter a diluição 10^{-1} , e assim sucessivamente até a diluição 10^{-8} . Fez-se a média aritmética das Unidades Formadoras de Colônias na diluição $10^{-7} > 10$ UFC/mL, e na diluição $10^{-8} \geq 1$ UFC/mL, segundo Cavalli-Sforza (1974).

Após um período mínimo de quinze dias, as alcoolaturas e hidroalcoolaturas foram filtradas com papel de filtro esterilizado e submetidas à destilação fracionada sob pressão reduzida em aparelho evaporador rotatório. A quantidade do álcool a ser retirado foi calculada segundo a Farmacopéia (Brasil, 1959; 2010), a porção alcoólica sendo desprezada e o extrato obtido vertido em vidro estéril para as análises.

Para o controle de assepsia dos procedimentos de extração, determinou-se a esterilidade de todos os extratos, retirando-se alíquotas de 5mL, semeadas em tubos contendo 5mL de *Brain Heart Infusion* (BHI, Oxoid®), incubados aerobicamente a 37°C por até 48 horas, confirmando-se sua esterilidade por plaqueamento em Agar Nutriente (Nutrient Agar, ACUMEDIA®, Maryland/Baltimore/USA).

Folhas, engaços e cascas dos três cultivares foram submetidos ao processo de decocção (planta seca) para obter as soluções antibacterianas a serem testadas, segundo a Farmacopéia (Brasil, 1959; 1988; 2010). Após a fervura, a amostra contida no frasco

Erlenmayer com uma tampa de vidro (placa de Petri) permaneceu sob fogo brando (bico de Bunsen e manta de amianto) por 15 minutos. Em seguida, o decocto foi resfriado em temperatura ambiente e coado com papel de filtro esterilizado para realizar as análises. O volume evaporado não foi repostado, padronizando-se o procedimento conforme os extratos obtidos, denominando-o de concentração 100%. Verificou-se a esterilidade do decocto realizando-se teste com um tubo controle contendo 5mL da amostra em 5mL de *Brain Heart Infusion* (BHI, Oxoid®), na proporção recomendada pelo fabricante, incubado a 37°C em estufa bacteriológica por 24 e 48 horas. Após estes períodos, foi realizado plaqueamento em ágar nutriente (Nutrient Agar, ACUMEDIA®, Maryland/Baltimore/USA) para confirmação da esterilidade.

Para a determinação da atividade antibacteriana dos extratos e do decocto, utilizou-se o Teste de Diluição segundo *Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft/Sociedade Alemã de Medicina Veterinária* (1981) e Reybrouck (1998). O resultado do confronto da bactéria com a solução antibacteriana em meio de cultura específico BHI (*Brain Heart Infusion* Oxoid®) foi lido como Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e, por Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) o mesmo resultado deste confronto, porém sob a influência dos desinibidores bacterianos acrescidos ao meio (Polisorbato/Tween 80 - REAÇÃO QUÍMICA®, Porto Alegre/ RS/BR, a 6%; L-histidina - LABSYBTH®, Diadema, SP/BR a 0,2% e Lecitina de soja HERBARIUM®, Colombo, PR/BR a 0,6%).

Com base na técnica do sistema de tubos múltiplos, citada por Avancini & Wiest (2008), Wiest *et al.* (2009 a, b), confrontaram-se os diferentes extratos e decoctos com 8 diluições seriais logarítmicas (10^{-1} a 10^{-8} UFC/mL) dos diferentes inóculos bacterianos.

As atividades antibacterianas IINIB e IINAB foram representadas por variáveis ordinais arbitrárias com valores de um (1) a nove (9), este representando atividade máxima e 1, ausência de atividade, como ilustrado:

9	8	7	6	5	4	3	2	1	Variáveis ordinais de Intensidade da ação
10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸		UFC/mL- diluições do inóculo inibidas ou inativadas
10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	n.a	UFC/mL- doses infectantes inibidas ou inativadas

IINIB = Intensidade da atividade de inibição bacteriana (bacteriostasia)

IINAB = Intensidade da atividade de inativação bacteriana (bactericidia)

UFC/mL = Unidade formadora de colônia por mililitro

n.a = nenhuma atividade

Foram realizadas Análises de Variância Fatorial (ANOVA) para as variáveis: “respostas valores de IINIB” e “valores de IINAB”, através do *General Linear Models Procedure* (PROC GLM) do Programa *Statistical Analysis System* (SAS).

Testes de Comparações Múltiplas de Tukey foram utilizados para comparar as médias de cultivares, tipos de bactérias, tipos de resíduos e concentrações dos extratos – Variável “resposta IINIB e IINAB”.

A extração de polifenóis totais foi realizada segundo a metodologia de Vinson *et al.* (2001). Amostras de 100µL do extrato (alcoólico ou hidroalcoólico de engaço, casca ou folhas) foram colocadas em tubos de rosca do tipo Eppendorf, sendo posteriormente acrescidos de 500µL de solução de extração contendo metanol (Grupo Químico®/BR) a 50% e ácido clorídrico (Nuclear®/BR) a 1,2M. Os tubos foram colocados em banho-maria a 90°C por três horas. Posteriormente, foram retirados do banho e, depois de resfriados em temperatura-ambiente, o volume foi completado a 1mL com metanol puro (Grupo Químico®/BR). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (Centrifuge 5415R- Eppendorf®, Germany) a 5.000 rpm por cinco minutos e os sobrenadantes foram obtidos com auxílio de uma pipeta automática, sendo estes denominados extratos de polifenóis totais. As extrações foram realizadas em triplicata (Faller & Fialho, 2009).

A determinação de polifenóis totais foi realizada utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu (Proton Química®/RS) segundo Karou *et al.* (2005). A solução de Folin foi preparada utilizando-se o reagente Folin-Ciocalteu e água deionizada 1:1 (v/v). Em tubo do tipo Eppendorf foram adicionados 30µL do extrato de polifenol, acrescidos de 75µL da solução de Folin-Ciocalteu. Após cinco minutos de reação, foram adicionados 75µL de solução de carbonato de sódio (Synth®/BR) (20%), e o volume foi completado com água deionizada até 600µL. A solução reagiu por 30 minutos e posteriormente foi

realizada a leitura em espectrofotômetro (UV Mini 1240, Shimadzu®, Japan) a 750nm, utilizando-se ácido gálico (Merck®/BR) como padrão. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g.

O conteúdo de antocianinas totais foi determinado pelo método da diferença de pH (Giusti & Wroslad, 2001) em que se dissolvem dois sistemas-tampão: cloreto de potássio (Merck®/BR) pH 1 (0,025M) e acetato de sódio (Synth®/BR) pH 4,5 (0,4M). Foram adicionados 1,8ml da correspondente solução-tampão a 0,2 ml da amostra diluída para se obter a densidade óptica na faixa de 540 e 700nm (Kuskoski *et al.*, 2006).

Resultados e discussão

O extrato etanólico (alcoolatura) de engaçó do cultivar ‘Bordô’ a 50% foi considerado o melhor resultado (valor atribuído de IINIB e IINAB máximo, 9) para todas as bactérias testadas e maior quantidade de polifenóis totais encontrados. Os resultados dos polifenóis totais quantificados dos diferentes extratos a 50% encontram-se abaixo (Tab. 1, 2 e 3), assim como os resultados de IINIB e IINAB para as 4 bactérias testadas.

TABELA 1: POLIFENÓIS TOTAIS DOS EXTRATOS DO CULTIVAR 'BORDÔ'
 (mg Equivalentes de Ácido Gálico .100g⁻¹ de amostra)
 VALORES IINIB (Inibição) e IINAB (Inativação) para as 4 bactérias, na concentração 50%.

EXTRATO ETANÓLICO				EXTRATO HIDROETANÓLICO			
PARTES	BACT.	Média ± Desvio Padrão (mgGAE/100g)	Atividade IINIB/IINAB	PARTES	BACT.	Média ± Desvio Padrão (mgGAE/100g)	Atividade IINIB/IINAB
	<i>(Staphylococcus aureus)</i>		9/9		<i>(Staphylococcus Aureus)</i>		3/3
CASCA	<i>(Enterococcus faecalis)</i>	252 ± 2	9/9	CASCA	<i>(Enterococcus faecalis)</i>	17,50 ± 0,75	4/4
	<i>(Salmonella Enteritidis)</i>		9/9		<i>(Salmonella Enteritidis)</i>		4/4
	<i>(Escherichia coli)</i>		9/9		<i>(Escherichia coli)</i>		4/4
	<i>(Staphylococcus aureus)</i>		6/5		<i>(Staphylococcus aureus)</i>		2/2
FOLHA	<i>(Enterococcus faecalis)</i>	72,50 ± 0,86	7/7	FOLHA	<i>(Enterococcus faecalis)</i>	26,40 ± 0,72	3/3
	<i>(Salmonella Enteritidis)</i>		7/7		<i>(Salmonella Enteritidis)</i>		3/3
	<i>(Escherichia coli)</i>		7/7		<i>(Escherichia coli)</i>		3/3
	<i>(Staphylococcus aureus)</i>		9/9		<i>(Staphylococcus aureus)</i>		7/6
ENGAÇO	<i>(Enterococcus faecalis)</i>	290,30 ± 1,47	9/9	ENGAÇO	<i>(Enterococcus faecalis)</i>	77,30 ± 1,05	7/7
	<i>(Salmonella Enteritidis)</i>		9/9		<i>(Salmonella Enteritidis)</i>		7/7
	<i>(Escherichia coli)</i>		9/9		<i>(Escherichia coli)</i>		7/7

TABELA 2: POLIFENÓIS TOTAIS DO CULTIVAR 'ISABEL'
 (mg Equivalentes de Ácido Gálico .100g⁻¹ de amostra)
 VALORES IINIB (Inibição) e IINAB (Inativação) para as 4 bactérias, na concentração 50%.

EXTRATO ETANÓLICO				EXTRATO HIDROETANÓLICO			
PARTES	BACT.	Média ± Desvio Padrão (mgGAE/100g)	IINIB/IINAB	PARTES	BACT.	Média ± Desvio Padrão (mgGAE/100g)	IINIB/IINAB
CASCA	<i>(Staphylococcus aureus)</i>	61,51 ± 2,25	5/5	CASCA	<i>(Staphylococcus aureus)</i>	10,10 ± 0,10	1/1
	<i>(Enterococcus faecalis)</i>		6/6		<i>(Enterococcus faecalis)</i>		1/1
	<i>(Salmonella Enteritidis)</i>		6/6		<i>(Salmonella Enteritidis)</i>		1/1
	<i>(Escherichia coli)</i>		6/6		<i>(Escherichia coli)</i>		1/1
FOLHA	<i>(Staphylococcus aureus)</i>	37,40 ± 1,70	3/1	FOLHA	<i>(Staphylococcus aureus)</i>	18,90 ± 1,87	2/1
	<i>(Enterococcus faecalis)</i>		3/3		<i>(Enterococcus faecalis)</i>		2/1
	<i>(Salmonella Enteritidis)</i>		3/3		<i>(Salmonella Enteritidis)</i>		2/1
	<i>(Escherichia coli)</i>		3/3		<i>(Escherichia coli)</i>		2/2
ENGAÇO	<i>(Staphylococcus aureus)</i>	263,20 ± 1,21	9/9	ENGAÇO	<i>(Staphylococcus aureus)</i>	66,60 ± 0,79	5/5
	<i>(Enterococcus faecalis)</i>		9/9		<i>(Enterococcus faecalis)</i>		6/6
	<i>(Salmonella Enteritidis)</i>		9/9		<i>(Salmonella Enteritidis)</i>		6/6
	<i>(Escherichia coli)</i>		9/9		<i>(Escherichia coli)</i>		6/6

TABELA 3: POLIFENÓIS TOTAIS DO CULTIVAR ‘MOSCATO’
(mg Equivalentes de Ácido Gálico .100g⁻¹ de amostra)
VALORES IINIB (Inibição) e IINAB (Inativação) para as 4 bactérias, na concentração 50%.

EXTRATO ETANÓLICO				EXTRATO HIDROETANÓLICO			
PARTES	BACT.	Média ± Desvio Padrão (mgGAE/100g)	IINIB/IINAB (<i>Staphylococcus aureus</i>)	PARTES	BACT.	Média ± Desvio Padrão (mgGAE/100g)	IINIB/IINAB
	(<i>Staphylococcus aureus</i>)		5/4		(<i>Staphylococcus aureus</i>)		1/1
CASCA	(<i>Enterococcus faecalis</i>)	43,03 ± 1,15	5/5	CASCA	(<i>Enterococcus faecalis</i>)	7,60 ± 0,29	1/1
	(<i>Salmonella Enteritidis</i>)		5/5		(<i>Salmonella Enteritidis</i>)		1/1
	(<i>Escherichia coli</i>)		5/5		(<i>Escherichia coli</i>)		1/1
	<i>Staphylococcus aureus</i>		2/1		<i>Staphylococcus aureus</i>		2/1
FOLHA	(<i>Enterococcus faecalis</i>)	19,40 ± 0,75	3/1	FOLHA	(<i>Enterococcus faecalis</i>)	12,70 ± 0,40	2/1
	(<i>Salmonella Enteritidis</i>)		3/1		(<i>Salmonella Enteritidis</i>)		2/1
	(<i>Escherichia coli</i>)		3/1		(<i>Escherichia coli</i>)		1/1
	<i>Staphylococcus aureus</i>		8/8		<i>Staphylococcus aureus</i>		3/3
ENGAÇO	(<i>Enterococcus faecalis</i>)	148 ± 0,50	8/8	ENGAÇO	(<i>Enterococcus faecalis</i>)	38,03 ± 1,45	4/3
	(<i>Salmonella Enteritidis</i>)		9/8		(<i>Salmonella Enteritidis</i>)		4/4
	(<i>Escherichia coli</i>)		9/8		(<i>Escherichia coli</i>)		4/4

As análises de antocianinas totais (mg em 100 gramas de amostra úmida) foram realizadas para todas as amostras de extratos, porém encontradas somente nas cascas de dois cultivares. A média dos resultados encontrados foram 73,9mg e 98,1mg para extrato etanólico (alcoholatura) da casca de uva ‘Isabel’ e da casca de uva ‘Bordô’, respectivamente. O cultivar ‘Moscato’ não possui antocianinas, pois mutações em dois genes reguladores das uvas brancas desativam a produção delas, conforme explicam Walker *et al.* (2007).

A relação entre os teores de polifenóis totais e a atividade antibacteriana foi determinada através da análise de Correlação Linear de Pearson entre as variáveis “respostas valores de IINAB”, “Compostos Fenólicos de IINAB”, “valores IINIB” e

“Compostos Fenólicos de IINIB”. Concluiu-se que existe correlação positiva entre “valores de IINIB e IINAB” e os valores dos Compostos Fenólicos, $p < 0,0001$, ou seja, à medida em que os valores de IINIB e IINAB aumentam, os valores dos Compostos Fenólicos também aumentam.

A relação entre os teores de antocianinas e a atividade antibacteriana não pôde ser determinada porque a maioria das amostras não apresentaram antocianinas, embora apresentassem atividade antibacteriana bastante expressiva (por exemplo, extrato etanólico de engaço).

Através da Análise de Variância (ANOVA), foi possível concluir que o efeito de Cultivar, Tipos de Método de Extração, Tipos de Resíduos, Bactérias e Concentração foi significativo, $p < 0,0001$ para todos os fatores, em relação à variável “resposta valores de IINIB e IINAB”.

Através do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, foi possível concluir, que a nota média de IINAB da Bactéria *S. aureus* difere significativamente da nota média de IINAB da Bactéria *E. coli*, *E. faecalis* e *Salmonella*, $p < 0,0001$, $p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente. *Staphylococcus aureus* foi a bactéria mais resistente.

Através da Análise de Variância (ANOVA), foi possível concluir que o efeito da interação “Cultivar, Tipos de Método de Extração, Tipos de Resíduos” foi significativo, $p < 0,0001$ em relação à variável “resposta Composto Fenólicos”.

Através do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey foi possível concluir que dentro dos tipos de extrações e resíduo (casca por exemplo), a média de compostos fenólicos do cultivar ‘Bordô’ difere significativamente da média dos cultivares ‘Isabel’ e ‘Moscato’, $p < 0,0001$. Da mesma forma que se pode concluir que dentro do cultivar ‘Bordô’ e tipo de extração, a média de compostos fenólicos da casca difere significativamente da média de compostos fenólicos de engaço e folha, $p < 0,0001$.

Conclusão

É possível concluir que os resíduos da viticultura, materiais de pouco valor agregado e potenciais poluentes, são fontes apreciáveis de compostos fenólicos.

Os resíduos da vinicultura, em especial o engaço dos três cultivares analisados, apresentaram atividade antibacteriana eficaz para bactérias de interesse zootécnico e veterinário. Desta forma, utilizar o extrato etanólico de engaço como desinfetante na produção animal e/ou na agroindústria familiar de produtos de origem animal é viável.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Orientador José Maria Wiest, pela oportunidade de crescimento profissional e amizade.

À Prof^a Jandyra Maria Guimarães Fachel e ao Técnico Administrativo Gilberto Pereira Mesquita, do Núcleo de Assessoria Estatística (NAE)/Instituto de Matemática da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo assessoramento estatístico.

Ao Sigproj - PROEX/IFRS nº 01/2011 - Bolsa de Extensão 2011 concedida a Sâmela Pereira da Silva, aluna do Curso Tecnólogo em Viticultura e Enologia 2010/II – IFRS *Campus* BG.

Referências

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 vinifera* L. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v. 27, n. 2, p. 394-400, abr.-jun. 2007.

AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M. Atividade desinfetante do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. e Schlecht.- Gutiferae ("escadinha"/"sinapismo"), frente a diferentes doses infectantes de *Staphylococcus aureus* (agente infeccioso em mastite bovina). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.1, p.64-9, 2008.

BRASIL. **Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil**. 2. ed., São Paulo: Siqueira, 1959.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. Método de contagem em placa. 4. ed. São Paulo: Atheneu, Parte 1, v.5.1.6.1, 1988.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, v. 1, 5. ed., p. 457-458, 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1.pdf>. Acessado em: 2 mai. 2013.

CAVALLI-SFORZA, L.; **Biometrie: grundzüge biologisch-medizinische statistik.** Stuttgart: Gustav Fischer, 1974. p. 201-4.

DA SILVA, L.M.L.R. **Caracterização dos subprodutos da vinificação.** Millenium, Viseu, v. 28, p. 123-133, out., 2003.

DE OLIVEIRA, D. A. **Caracterização fitoquímica e biológica de extratos obtidos de bagaço de uva (*Vitis Vinifera*) das variedades Merlot e Syrah.** 2010. 211p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT/Sociedade Alemã de Medicina Veterinária). **Richtlinien zur prüfung chemischer desinfektionsmittel für die veterinärmedizin** (Normas para testes de desinfetantes químicos para a Medicina Veterinária). In: SCHLIESSER, Th.; Strauch D. Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch – und Milchwirtschaft. Stuttgart: Enke Verlag. 47-55p, 1981.

FALLER, A.L.K. & FIALHO, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.43, n.2, p.211-218, 2009.

GIUSTI, M.M. & WROLSTAD, R.E. Antocyanins: characterization and measurement with uv-visible spectrometry. In: Wrolstad, R.E. (Ed.) **Current protocols in food analytical chemistry.** New York: John Wiley & Sons, 2001. Unit F1.2.1-13.

GUERRA, C.G. Vinho tinto. In: Venturini Filho, W. G. **Bebidas alcoólicas: Ciência e tecnologia.** São Paulo: Blucher, cap. 11, 209-233; 2010.

KAROU D., DICKO M.H., SIMPORE J., TRAORE A.S. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. **African Journal of Biotechnology**, v.4, n.8, p.823-828, 2005.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; MORALES, M.T.; FETT, R. Frutas tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Revista Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1283-1287, 2006.

OJEDA, H. **Los compuestos fenólicos de la uva**. Información técnica pela industria vitivinícola. Mendoza- Argentina. Revista n 4, ano IV. Sept-Oct 2007.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Revista Brasileira de Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n.4, p. 659-664, 2005.

MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K.B.; TIVERON, A. P.; *et al.* Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.6, p.1088-1093, jun, 2011.

MELLO, L.M.R **Viticultura Brasileira - Panorama 2011**. Comunicado Técnico 115, Março, 2012. Bento Gonçalves, RS. Disponível em <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot115.pdf>> Acessado em: 29 de abril de 2013.

PINTO, E.P.; MOREIRA, A. S.; MACHADO, M.R.G.; RODRIGUES, R. S. A uva como alimento funcional: uma revisão. **Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**, n. 3, p. 66-73, 2011.

PORTUGAL, C. B.; PALACIOS, A. Vale dos Vinhedos: perfil produtivo de vinícolas familiares e diagnóstico qualitativo, microbiológico e sensorial de vinhos. **Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**, n. 4, p. 18-27, 2012.

REYBROUCK, G. The testing of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 41, p.269-71, 1998.

SAUTTER, C. K. et al. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v.25, n.3, p.437-442, jul./set. 2005.

VINSON, J.A., SU X., ZUBIK, L., BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.11, p. 5315-5321, 2001.

WALKER A. R.; LEE E.; PÂNTANOS J.; MCDAVID D. A.; THOMAS M. R.; ROBINSON S. P. Uvas brancas surgiu por meio da mutação dos dois genes reguladores semelhantes e adjacentes. **Planta Journal**.2007 Mar; 49 (5):772-85.

WIEST, J. M.; CARVALHO, H. H.; AVANCINI, C. A. M.; GONÇALVES, A. R. Atividade anti-estafilócica em extratos de plantas com indicativo medicinal ou condimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.02, 2009 (a).

WIEST, J. M., CARVALHO, H. H. C., AVANCINI, C. A. M., GONÇALVES, A. R. Inibição e inativação *in vitro* de *Salmonella* spp. com extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.1, p.119-127, 2009 (b).

APÊNDICES**TABELAS**

TABELA 7: Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB - ausência de desinibidores bacterianos) e Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB – presença de desinibidores bacterianos) de Extrato Hidroetanólico dos resíduos de uva ISABEL' e suas concentrações, em diferentes tempos de leitura, contra Bactérias Gram Positivas

Conc.	Inóculo Gram +		<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Enterococcus faecalis</i>		
			Folha	Casca	Engaço	Folha	Casca	Engaço
		Resíduos						
		Tempo (horas)						
50%	24	IINIB	2 2 1	1 1 1	6 5 5	2 2 2	1 1 1	6 6 6
		IINAB	1 1 1	1 1 1	6 5 5	1 1 1	1 1 1	6 6 6
	48	IINIB	2 2 1	1 1 1	6 5 5	2 2 2	1 1 1	6 6 6
		IINAB	1 1 1	1 1 1	6 5 5	1 1 1	1 1 1	6 6 6
	72	IINIB	2 2 1	1 1 1	6 5 5	2 2 2	1 1 1	6 6 6
		IINAB	1 1 1	1 1 1	6 5 5	1 1 1	1 1 1	6 6 6
144	IINAB	2 2 1	1 1 1	6 5 5	2 2 2	1 1 1	6 6 6	
40%	24	IINIB	1 1 1	1 1 1	5 5 5	2 2 1	1 1 1	6 6 6
		IINAB	1 1 1	1 1 1	5 5 5	1 1 1	1 1 1	6 6 6
	48	IINIB	1 1 1	1 1 1	5 5 5	2 2 1	1 1 1	6 6 6
		IINAB	1 1 1	1 1 1	5 5 5	1 1 1	1 1 1	6 6 6
	72	IINIB	1 1 1	1 1 1	5 5 5	2 2 1	1 1 1	6 6 6
		IINAB	1 1 1	1 1 1	5 5 5	1 1 1	1 1 1	6 6 6
144	IINAB	1 1 1	1 1 1	5 5 5	2 2 1	1 1 1	6 6 6	
30%	24	IINIB	1 1 1	1 1 1	4 4 4	2 1 1	1 1 1	6 6 6
		IINAB	1 1 1	1 1 1	2 2 2	1 1 1	1 1 1	5 5 5
	48	IINIB	1 1 1	1 1 1	4 4 4	2 1 1	1 1 1	6 6 6
		IINAB	1 1 1	1 1 1	2 2 2	1 1 1	1 1 1	5 5 5
	72	IINIB	1 1 1	1 1 1	4 4 4	2 1 1	1 1 1	6 6 6
		IINAB	1 1 1	1 1 1	2 2 2	1 1 1	1 1 1	5 5 5
144	IINAB	1 1 1	1 1 1	4 4 4	2 1 1	1 1 1	6 6 6	
20%	24	IINIB	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	2 2 2
		IINAB	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1
	48	IINIB	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	2 2 2
		IINAB	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1
	72	IINIB	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	2 2 2
		IINAB	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1
144	IINAB	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	2 2 2	
			1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	

TABELA 8: Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB - ausência de desinibidores bacterianos) e Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB – presença de desinibidores bacterianos) de Extrato Hidroetanólico dos resíduos de uva ISABEL' e suas concentrações, em diferentes tempos de leitura, contra Bactérias Gram Negativas

Conc.	Inóculo Gram -	Resíduos	<i>Salmonella</i> Enteritidis			<i>Escherichia coli</i>		
			Folha	Casca	Engaço	Folha	Casca	Engaço
		Tempo (horas)						
50%	24	IINIB	2 2 2	1 1 1	6 6 6	2 2 2	1 1 1	6 6 6
		IINAB	1 1 1	1 1 1	6 6 6	2 2 2	1 1 1	6 6 6
	48	IINIB	2 2 2	1 1 1	6 6 6	2 2 2	1 1 1	6 6 6
		IINAB	1 1 1	1 1 1	6 6 6	2 2 2	1 1 1	6 6 6
	72	IINIB	2 2 2	1 1 1	6 6 6	2 2 2	1 1 1	6 6 6
		IINAB	1 1 1	1 1 1	6 6 6	2 2 2	1 1 1	6 6 6
144	IINAB	2 2 2	1 1 1	6 6 6	2 2 2	1 1 1	6 6 6	
40%	24	IINIB	2 2 2	1 1 1	6 6 6	2 2 2	1 1 1	6 6 6
		IINAB	1 1 1	1 1 1	6 6 6	1 1 1	1 1 1	6 6 6
	48	IINIB	2 2 2	1 1 1	6 6 6	2 2 2	1 1 1	6 6 6
		IINAB	1 1 1	1 1 1	6 6 6	1 1 1	1 1 1	6 6 6
	72	IINIB	2 2 2	1 1 1	6 6 6	2 2 2	1 1 1	6 6 6
		IINAB	1 1 1	1 1 1	6 6 6	1 1 1	1 1 1	6 6 6
144	IINAB	2 2 2	1 1 1	6 6 6	2 2 2	1 1 1	6 6 6	
30%	24	IINIB	2 1 1	1 1 1	6 6 6	2 2 2	1 1 1	4 4 4
		IINAB	1 1 1	1 1 1	4 4 4	1 1 1	1 1 1	4 4 4
	48	IINIB	2 1 1	1 1 1	6 6 6	2 2 2	1 1 1	4 4 4
		IINAB	1 1 1	1 1 1	4 4 4	1 1 1	1 1 1	4 4 4
	72	IINIB	2 1 1	1 1 1	6 6 6	2 2 2	1 1 1	4 4 4
		IINAB	1 1 1	1 1 1	4 4 4	1 1 1	1 1 1	4 4 4
144	IINAB	2 1 1	1 1 1	6 6 6	2 2 2	1 1 1	4 4 4	
20%	24	IINIB	1 1 1	1 1 1	2 2 2	1 1 1	1 1 1	2 2 2
		IINAB	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1
	48	IINIB	1 1 1	1 1 1	2 2 2	1 1 1	1 1 1	2 2 2
		IINAB	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1
	72	IINIB	1 1 1	1 1 1	2 2 2	1 1 1	1 1 1	2 2 2
		IINAB	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1
144	IINAB	1 1 1	1 1 1	2 2 2	1 1 1	1 1 1	2 2 2	
			1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	

TABELA 13: CONTROLE - Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB - ausência de desinibidores bacterianos) e Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB – presença de desinibidores bacterianos) de Extrato Etanólico dos resíduos de uva '**NIÁGARA ROSADA**' e suas concentrações, contra a Bactéria *Staphylococcus aureus*, em diferentes tempos de leitura

		Inóculo <i>S.aureus</i>	
		Gram +	
		Resíduos	Casca Engaço
		Tempo (horas)	
Conc.		IINIB	6 6 6 9 9 9
	24	IINAB	6 6 6 9 9 9
50%		IINIB	6 6 6 9 9 9
	48	IINAB	6 6 6 9 9 9
		IINIB	6 6 6 9 9 9
	72	IINAB	6 6 6 9 9 9
		IINIB	6 6 6 9 9 9
	144	IINAB	6 6 6 9 9 9
40%		IINIB	4 4 4 8 8 8
	24	IINAB	4 4 4 8 8 8
		IINIB	4 4 4 8 8 8
	48	IINAB	4 4 4 8 8 8
		IINIB	4 4 4 8 8 8
	72	IINAB	4 4 4 8 8 8
30%		IINIB	3 3 3 7 7 7
	24	IINAB	1 1 1 6 6 6
		IINIB	3 3 3 7 7 7
	48	IINAB	1 1 1 6 6 6
		IINIB	3 3 3 7 7 7
	72	IINAB	1 1 1 6 6 6
20%		IINIB	1 1 1 3 3 3
	24	IINAB	1 1 1 1 1 1
		IINIB	1 1 1 3 3 3
	48	IINAB	1 1 1 1 1 1
		IINIB	1 1 1 3 3 3
	72	IINAB	1 1 1 1 1 1
	IINIB	1 1 1 3 3 3	
	144	IINAB	1 1 1 1 1 1

TABELA 14: Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB - ausência de desinibidores bacterianos) e Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana/bactericida (IINAB – presença de desinibidores bacterianos) de **Calda Bordalesa** em duas concentrações, em diferentes tempos de leitura

Conc.	Inóculo Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>	
		Tempo (horas)	Atividade	Repetições	Repetições
100%	24	IINIB	1 1 1	1 1 1	
		IINAB	1 1 1	1 1 1	
		IINIB	1 1 1	1 1 1	
		IINAB	1 1 1	1 1 1	
		IINIB	1 1 1	1 1 1	
		IINAB	1 1 1	1 1 1	
	48	IINIB	1 1 1	1 1 1	
		IINAB	1 1 1	1 1 1	
		IINIB	1 1 1	1 1 1	
		IINAB	1 1 1	1 1 1	
		IINIB	1 1 1	1 1 1	
		IINAB	1 1 1	1 1 1	
		IINIB	1 1 1	1 1 1	
		IINAB	1 1 1	1 1 1	
72	IINIB	1 1 1	1 1 1		
	IINAB	1 1 1	1 1 1		
	IINIB	1 1 1	1 1 1		
	IINAB	1 1 1	1 1 1		
	IINIB	1 1 1	1 1 1		
	IINAB	1 1 1	1 1 1		
	IINIB	1 1 1	1 1 1		
	IINAB	1 1 1	1 1 1		
50%	24	IINIB	1 1 1	1 1 1	
		IINAB	1 1 1	1 1 1	
		IINIB	1 1 1	1 1 1	
		IINAB	1 1 1	1 1 1	
		IINIB	1 1 1	1 1 1	
		IINAB	1 1 1	1 1 1	
	48	IINIB	1 1 1	1 1 1	
		IINAB	1 1 1	1 1 1	
		IINIB	1 1 1	1 1 1	
		IINAB	1 1 1	1 1 1	
		IINIB	1 1 1	1 1 1	
		IINAB	1 1 1	1 1 1	
		IINIB	1 1 1	1 1 1	
		IINAB	1 1 1	1 1 1	
72	IINIB	1 1 1	1 1 1		
	IINAB	1 1 1	1 1 1		
	IINIB	1 1 1	1 1 1		
	IINAB	1 1 1	1 1 1		
	IINIB	1 1 1	1 1 1		
	IINAB	1 1 1	1 1 1		
	IINIB	1 1 1	1 1 1		
	IINAB	1 1 1	1 1 1		
100%	24	IINIB	3 3 3	2 2 2	
		IINAB	1 1 1	1 1 1	
		IINIB	3 3 2	2 2 2	
		IINAB	1 1 1	1 1 1	
		IINIB	3 2 2	1 2 2	
		IINAB	1 1 1	1 1 1	
	48	IINIB	3 2 1	1 1 2	
		IINAB	1 1 1	1 1 1	
		IINIB	1 1 1	1 1 1	
		IINAB	1 1 1	1 1 1	
		IINIB	1 1 1	1 1 1	
		IINAB	1 1 1	1 1 1	
		IINIB	1 1 1	1 1 1	
		IINAB	1 1 1	1 1 1	
72	IINIB	1 1 1	1 1 1		
	IINAB	1 1 1	1 1 1		
	IINIB	1 1 1	1 1 1		
	IINAB	1 1 1	1 1 1		
	IINIB	1 1 1	1 1 1		
	IINAB	1 1 1	1 1 1		
	IINIB	1 1 1	1 1 1		
	IINAB	1 1 1	1 1 1		

TABELA 15: POLIFENÓIS TOTAIS DOS EXTRATOS DE RESÍDUOS
(mg Equivalentes de Ácido Gálico .100 g⁻¹ de amostra)

EXTRATO ETANÓLICO			
CULTIVARES	Casca (mgGAE/100g)	Folha (mgGAE/100g)	Engaço (mgGAE/100g)
BORDÔ	351 ± 1	137 ± 1	477 ± 1,77
ISABEL	120,60 ± 1,13	76,30 ± 1,49	325,50 ± 1,40
MOSCATO	80,40 ± 1,91	25,10 ± 0,70	246,60 ± 1,52

EXTRATO HIDROETANÓLICO			
CULTIVARES	Casca (mgGAE/100g)	Folha (mgGAE/100g)	Engaço (mgGAE/100g)
BORDÔ	29,60 ± 2,18	42,20 ± 2,10	159,80 ± 0,53
ISABEL	18,3 ± 0,90	39,9 ± 1,05	97 ± 1,41
MOSCATO	13,8 ± 1,04	23,3 ± 1,30	59,8 ± 1,65

Tabela: 16 Teste de Suspensão Simples: Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana/bactericida (IINAB - presença de desinibidores bacterianos) de Extrato Etanólico de **engajo** de uva '**Bordô**' em 3 concentrações, em diferentes tempos de exposição

Concentração	Tempo (minutos)	IINAB	Inóculo Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>		
				50%	40%	30%
				3 Repetições		
	5	IINAB		1 1 1	1 1 1	1 1 1
	15	IINAB		8 7 7	6 6 5	1 1 1
	30	IINAB		9 9 9	8 8 8	4 5 5
	60	IINAB		9 9 9	8 8 8	6 6 6

Concentração	Tempo (minutos)	IINAB	Inóculo Gram +	<i>Enterococcus faecalis</i>		
				50%	40%	30%
				3 Repetições		
	5	IINAB		1 1 1	1 1 1	1 1 1
	15	IINAB		8 8 8	7 7 8	2 3 3
	30	IINAB		9 9 9	9 9 9	7 8 8
	60	IINAB		9 9 9	9 9 9	8 8 8

Concentração	Tempo (minutos)	IINAB	Inóculo Gram -	<i>Salmonella Enteritidis</i>		
				50%	40%	30%
				3 Repetições		
	5	IINAB		1 1 1	1 1 1	1 1 1
	15	IINAB		8 8 8	7 8 8	5 6 6
	30	IINAB		9 9 9	9 9 9	8 8 8
	60	IINAB		9 9 9	9 9 9	8 8 8

Concentração	Tempo (minutos)	IINAB	Inóculo Gram -	<i>Escherichia coli</i>		
				50%	40%	30%
				3 Repetições		
	5	IINAB		1 1 1	1 1 1	1 1 1
	15	IINAB		8 9 9	8 8 7	6 6 6
	30	IINAB		9 9 9	9 9 9	8 8 8
	60	IINAB		9 9 9	9 9 9	8 8 8

Tabela: 17 Teste de Suspensão com Suporte: Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana/ bactericida (IINAB - presença de desinibidores bacterianos) de Extrato Etanólico de **engajo** de uva '**Bordô**' a **50%** com a presença de **suporte** e em diferentes tempos de exposição, 3 repetições

Tempo (minutos)	Inóculo Gram +		<i>Staphylococcus aureus</i>		
			Suporte	Pano	Madeira
5	IINAB		1 1 1	1 1 1	
15	IINAB		6 6 6	1 1 1	
30	IINAB		9 9 9	1 1 1	
60	IINAB		9 9 9	5 5 5	

Tempo (minutos)	Inóculo Gram +		<i>Enterococcus faecalis</i>		
			Suporte	Pano	Madeira
5	IINAB		1 1 1	1 1 1	
15	IINAB		7 7 7	1 1 1	
30	IINAB		9 9 9	1 1 1	
60	IINAB		9 9 9	6 6 6	

Tempo (minutos)	Inóculo Gram -		<i>Salmonella Enteritidis</i>		
			Suporte	Pano	Madeira
5	IINAB		1 1 1	1 1 1	
15	IINAB		1 1 1	1 1 1	
30	IINAB		9 9 9	1 1 1	
60	IINAB		9 9 9	6 6 6	

Tempo (minutos)	Inóculo Gram -		<i>Escherichia coli</i>		
			Suporte	Pano	Madeira
5	IINAB		1 1 1	1 1 1	
15	IINAB		1 1 1	1 1 1	
30	IINAB		1 1 1	1 1 1	
60	IINAB		9 9 9	6 6 6	

Tabela: 18 Teste de Suspensão com matéria orgânica: Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB - ausência de desinibidores bacterianos) e Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB - presença de desinibidores bacterianos) de Extrato Etanólico de **engajo** de uva '**Bordô**' a **50%** com presença de matéria orgânica, **leite integral a 20%**

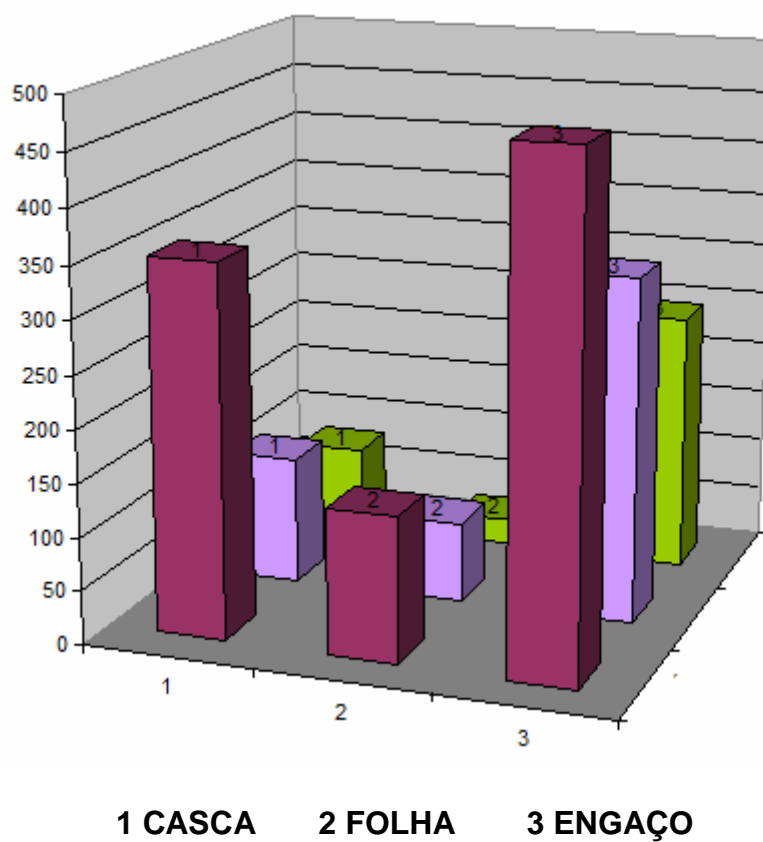
Mat. Orgânica		Inóculo Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>			
TEMPO						
Concentração Extrato Alcólico de Engajo a 50%						
30 MIN	Leite		IINIB	5	6	6
	Integral	24	IINAB	5	5	6
Inóculo Gram -		<i>Salmonella Enteritidis</i>				
Concentração Extrato Alcólico de Engajo a 50%						
	Leite		IINIB	9	8	8
	Integral	24	IINAB	8	8	7
<hr/>						
Mat. Orgânica		Inóculo Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>			
TEMPO						
Concentração Extrato Alcólico de Engajo a 50%						
60 MIN	Leite		IINIB	7	7	7
	Integral	24	IINAB	7	6	7
Inóculo Gram -		<i>Salmonella Enteritidis</i>				
Concentração Extrato Alcólico de Engajo a 50%						
	Leite		IINIB	9	8	8
	Integral	24	IINAB	8	8	8

Tabela: 19 Teste de Suspensão com matéria orgânica: Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB - ausência de desinibidores bacterianos) e Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB - presença de desinibidores bacterianos) de Extrato Etanólico de **engajo** de uva '**Bordô**' a **50%** com presença de matéria orgânica, **albumina sérica bovina a 20%**

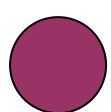
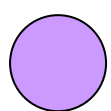

Mat. Orgânica		Inóculo Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>			
TEMPO						
Concentração Extrato Alcólico de Engajo a 50%						
30 MIN	Albumina		IINIB	5	5	4
	Ser. Bov.	24	IINAB	2	1	1
Inóculo Gram -		<i>Salmonella Enteritidis</i>				
Concentração Extrato Alcólico de Engajo a 50%						
	Albumina		IINIB	7	7	6
	Ser. Bov.	24	IINAB	4	4	3
Mat. Orgânica		Inóculo Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>			
TEMPO						
Concentração Extrato Alcólico de Engajo a 50%						
60 MIN	Albumina		IINIB	6	6	6
	Ser. Bov.	24	IINAB	6	6	5
Inóculo Gram -		<i>Salmonella Enteritidis</i>				
Concentração Extrato Alcólico de Engajo a 50%						
	Albumina		IINIB	8	8	7
	Ser. Bov.	24	IINAB	7	7	7

COMPOSTOS FENÓLICOS

(mg Equivalentes de Ácido Gálico .100 g⁻¹ de amostra)



Legenda

-  BORDÔ
-  ISABEL
-  MOSCATO

PROTOCOLO

Planta/Parte utilizada: ..Engaço da uva ‘Bordô’

Bactéria:.....*Staphylococcus aureus*..... **Data:** 28/11/2011

Data alc./hidroalc.: .. 14/02/2011.. **Acesso:** ..Vinícola Mena Kaho..

Responsável: .. Raquel... **Tipo de extração:** .. Alcoolatura.....

Proporção: 480g: 1.200 mL **Extrato:** Etanólico a 50%

	Tubo 7	Tubo 8	Inóculo
Contagem	144	17	144x10 ⁷
U.F.C./mL			

$$X = (\Sigma Ci) / (\Sigma ni \cdot zi)$$

C = nº colônias contadas

n = nº placas

z = diluições utilizadas

+ = crescimento/ - = sem

EXTRAÇÃO

G.alcoólica aparente (°GL):73°.....

Temperatura (°C):26° C.....

G.alcoólica real (°GL):69,5°.....

Volume (mL):1.150

Volume de álcool (mL):758.....

Volume de extrato (mL):392.....

$$\text{Cálculo: } V_{\text{álcool retirar}} = (332 * V * G) / 35.000$$

(V= Volume de tintura e G = graduação alcoólica)

Desinibidor	1 (-1)	2 (-2)	3 (-3)	4 (-4)	5 (-5)	6 (-6)	7 (-7)	8 (-8)
Com	24 h	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-	-	-	-
	72 h	-	-	-	-	-	-	-
	144 h	-	-	-	-	-	-	-
Sem	24 h	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-	-	-	-
	72 h	-	-	-	-	-	-	-
	144 h	-	-	-	-	-	-	-
Nota	9							

Planta/Parte utilizada: ..Casca da uva 'Bordô'

Bactéria:.....*Staphylococcus aureus*..... **Data:** 05/12/2011

Data alc./hidroalc.: .. 16/02/2011.. **Acesso:** ..Vinícola Mena Kaho..

Responsável: .. Raquel... **Tipo de extração:** .. Alcoolatura.....

Proporção: 400g: 1000mL..... **Extrato:** Etanólico a 50%

	Tubo 7	Tubo 8	Inóculo
Contagem U.F.C./mL	108	10	108x10 ⁷

$$\bar{X} = (\sum Ci) / (\sum ni \cdot zi)$$

C = n° colônias contadas

n = n° placas

z = diluições utilizadas

+ = crescimento/ - = sem

EXTRAÇÃO

G.alcoólica aparente (°GL):68°.....

Temperatura (°C):27° C.....

G.alcoólica real (°GL):64°.....

Volume (mL):970.....

Volume de álcool (mL):567,5.....

Volume de extrato (mL):402,5.....

$$\text{Cálculo: } V_{\text{álcool retirar}} = (332 * V * G) / 35.000$$

(V= Volume de tintura e G = graduação alcoólica)

Desinibidor	1 (-1)	2 (-2)	3 (-3)	4 (-4)	5 (-5)	6 (-6)	7 (-7)	8 (-8)
Com	24 h	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-	-	-	-
	72 h	-	-	-	-	-	-	-
	144 h	-	-	-	-	-	-	-
Sem	24 h	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-	-	-	-
	72 h	-	-	-	-	-	-	-
	144 h	-	-	-	-	-	-	-
Nota	9							

Planta/Parte utilizada: ..Folha da uva 'Isabel'

Bactéria:.....*Staphylococcus aureus*..... **Data:** 25/10/2011

Data alc./hidroalc.: .. 11/03/2011.. **Acesso:** ..Vinícola Mena Kaho..

Responsável: .. Raquel... **Tipo de extração:** .. Alcoolatura.....

Proporção: 300g: 750 mL **Extrato:** Etanólico a 50%

	Tubo 7	Tubo 8	Inóculo
Contagem U.F.C./mL	117	14	117x10 ⁷

$$X = (\Sigma Ci) / (\Sigma ni \cdot zi)$$

C = n° colônias contadas

n = n° placas

z = diluições utilizadas

+ = crescimento/ - = sem

EXTRAÇÃO

G.alcoólica aparente (°GL):73°

Temperatura (°C):25° C.....

G.alcoólica real (°GL):69,8°

Volume (mL):500.....

Volume de álcool (mL):331.....

Volume de extrato (mL): 169.....

$$\text{Cálculo: } V_{\text{álcool retirar}} = (332 * V * G) / 35.000$$

(V= Volume de tintura e G = graduação alcoólica)

Desinibidor	1 (-1)	2 (-2)	3 (-3)	4 (-4)	5 (-5)	6 (-6)	7 (-7)	8 (-8)	
Com	24 h	+	+	+	+	+	+	-	-
	48 h	+	+	+	+	+	+	-	-
	72 h	+	+	+	+	+	+	-	-
	144 h	+	+	+	+	+	+	-	-
Nota							3		
Sem	24 h	+	+	+	+	+	-	-	-
	48 h	+	+	+	+	+	-	-	-
	72 h	+	+	+	+	+	-	-	-
	144 h	+	+	+	+	+	-	-	-
Nota						4			

Planta/Parte utilizada: .Casca da uva 'Niágara Rosada'. – Controle..

Bactéria:...*Staphylococcus aureus*..... **Data:** 03/04/2012

Data alc./hidroalc.: .. 21/02/2011.. **Acesso:** .Embrapa Uva e vinho..

Responsável: .. Raquel... **Tipo de extração:** .. Alcoolatura.....

Proporção: 252g: 630 mL **Extrato:** Etanólico a 50%

Contagem U.F.C./mL	Tubo 7	Tubo 8	Inóculo
	111	12	111x10 ⁷

$$X = (\Sigma Ci) / (\Sigma ni \cdot zi)$$

C = n° colônias contadas

n = n° placas

z = diluições utilizadas

+ = crescimento/ - = sem

EXTRAÇÃO

G.alcoólica aparente (°GL):73°.....

Temperatura (°C):23° C.....

G.alcoólica real (°GL):70,5°.....

Volume (mL):625.....

Volume de álcool (mL):418.....

Volume de extrato (mL):207.....

$$\text{Cálculo: } V_{\text{álcool retirar}} = (332 * V * G) / 35.000$$

(V= Volume de tintura e G = graduação alcoólica)

Desinibidor	1 (-1)	2 (-2)	3 (-3)	4 (-4)	5 (-5)	6 (-6)	7 (-7)	8 (-8)
Com	24 h	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-	-	-	-
	72 h	-	-	-	-	-	-	-
	144 h	-	-	-	-	-	-	-
Sem	24 h	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-	-	-	-
	72 h	-	-	-	-	-	-	-
	144 h	-	-	-	-	-	-	-
Nota	9							



Fig. 03 Engaço de uva



Fig. 04 Bagaço de uva

ANEXOS

Quadro 1 - Amplitude da composição (mínimo e máximo) do mosto de uva fresca, sã e madura.

COMPONENTE	% MÍNIMO	% MÁXIMO
Água	70	85
Carboidratos	15	25
Dextrose (glicose)	8	13
Levulose (frutose)	7	12
Pentoses	0,08	0,20
Pectinas	0,01	0,10
Inositol	0,02	0,08
Ácidos orgânicos	0,3	1,5
Ácido tartárico	0,2	1,0
Ácido málico	0,1	0,8
Ácido cítrico	0,3	0,05
Tanino	0,01	0,10
Compostos nitrogenados	0,03	0,17
Proteína	0,001	0,01
Amina	0,017	0,11
Humina	0,001	0,002
Amida	0,001	0,004
Amoníaco	0,001	0,012
Resíduos	0,01	0,02
Compostos minerais	0,3	0,5
Al	Traços	0,003
B	Traços	0,007
Ca	0,004	0,025
Cloretos	0,001	0,010
Cu	Traços	0,0003
Fé	Traços	0,003
Mg	0,010	0,025
Mn	traços	0,0051
Na	traços	0,020
K	0,15	0,25
P (fosfatos)	0,02	0,05

Ru	Traços	0,001
Si (ácido sílico)	0,002	0,005
S (sulfatos)	0,003	0,035

Fonte: Adaptado de Winkler et al (1974); Hidalgo (2002); Giovannini, E. & Manfroi, V. (2009).

Quadro 2 Força Real dos Líquidos Espirituosos
(Graduação Alcoólica X Temperatura)

TÁBUA DA FORÇA REAL DOS LÍQUIDOS ESPIRITUOSOS															
Temp. °C	56c	57c	58c	59c	60c	61c	62c	63c	64c	65c	66c	67c	68c	69c	70c
30ª	50,6	51,6	52,6	53,6	54,7	55,7	56,7	57,8	58,8	59,9	60,9	61,9	63,0	64,0	65,0
29ª	51,0	52,0	53,0	54,0	55,0	56,0	57,1	58,1	59,2	60,2	61,2	62,3	63,3	64,3	65,4
28ª	51,3	52,3	53,3	54,4	55,4	56,4	57,5	58,5	59,5	60,6	61,6	62,6	63,7	64,7	65,7
27ª	51,7	52,7	53,7	54,8	55,8	56,8	57,8	58,9	59,9	60,9	61,9	63,0	64,0	65,0	66,0
26ª	52,0	53,0	54,0	55,1	56,1	57,1	58,1	59,2	60,2	61,3	62,3	63,3	64,3	65,3	66,4
25ª	52,4	53,4	54,4	55,5	56,5	57,5	58,5	59,5	60,6	61,6	62,6	63,7	64,7	65,7	66,7
24ª	52,8	53,8	54,8	55,8	56,8	57,8	58,9	59,9	61,0	62,0	63,0	64,0	65,0	66,0	67,1
23ª	53,1	54,1	55,1	56,1	57,1	58,1	59,2	60,2	61,3	62,3	63,3	64,3	65,4	66,4	67,4
22ª	53,5	54,5	55,5	56,5	57,5	58,5	59,5	60,6	61,6	62,7	63,7	64,7	65,7	66,7	67,8
21ª	53,9	54,9	55,9	56,9	57,9	58,9	59,9	61,0	62,0	63,0	64,0	65,0	66,0	67,0	68,1
20ª	54,2	55,2	56,2	57,2	58,2	59,2	60,3	61,3	62,3	63,3	64,3	65,4	66,4	67,4	68,4
19ª	54,6	55,6	56,6	57,6	58,6	59,6	60,6	61,6	62,7	63,7	64,7	65,7	66,7	67,7	68,7
18ª	54,9	55,9	56,9	57,9	58,9	59,9	61,0	62,0	63,0	64,0	65,0	66,0	67,0	68,0	69,0
17ª	55,3	56,3	57,3	58,3	59,3	60,3	61,3	62,2	63,3	64,3	65,3	66,3	67,3	68,3	69,3
16ª	55,6	56,6	57,6	58,6	59,6	60,6	61,7	62,7	63,7	64,7	65,7	66,7	67,7	68,7	69,7
15ª	56,0	57,0	58,0	59,0	60,0	61,0	62,0	63,0	64,0	65,0	66,0	67,0	68,0	69,0	70,0
14ª	56,3	57,3	58,3	59,3	60,3	61,3	62,3	63,3	64,3	65,3	66,3	67,3	68,3	69,3	70,3
13ª	56,7	57,7	58,7	59,7	60,7	61,7	62,7	63,7	64,7	65,7	66,7	67,7	68,7	69,6	70,6
12ª	57,0	58,0	59,0	60,0	61,0	62,0	63,0	64,0	65,0	66,0	67,0	68,0	69,0	70,0	71,0
11ª	57,4	58,4	59,4	60,4	61,4	62,4	63,4	64,4	65,4	66,4	67,3	68,3	69,3	70,3	71,3
10ª	57,8	58,8	59,7	60,7	61,7	62,7	63,7	64,7	65,7	66,7	67,6	68,6	69,6	70,6	71,6
	71c	72c	73c	74c	75c	76c	77c	78c	79c	80c	81c	82c	83c	84c	85c
30ª	66,1	67,1	68,2	69,2	70,3	71,3	72,3	73,3	74,4	75,4	76,4	77,5	78,6	79,6	80,6
29ª	66,4	67,4	68,5	69,5	70,6	71,6	72,6	73,7	74,7	75,7	76,7	77,8	78,9	79,9	80,9
28ª	66,8	67,8	68,8	69,9	70,9	71,9	73,0	74,0	75,0	76,0	77,1	78,1	79,2	80,2	81,2
27ª	67,1	68,1	69,2	70,2	71,2	72,2	73,3	74,3	75,3	76,3	77,4	78,4	79,5	80,5	81,5
26ª	67,4	68,4	69,5	70,5	71,5	72,5	73,6	74,6	75,6	76,7	77,7	78,7	79,8	80,8	81,8
25ª	67,8	68,8	69,8	70,8	71,8	72,8	73,9	74,9	76,0	77,0	78,0	79,0	80,1	81,1	82,1
24ª	68,1	69,1	70,1	71,2	72,2	73,2	74,2	75,2	76,6	77,6	78,6	79,6	80,7	81,7	82,7
23ª	68,4	69,4	70,5	71,5	72,5	73,5	74,5	75,2	76,3	77,3	78,3	79,3	80,4	81,4	82,4
22ª	68,8	69,8	70,8	71,8	72,8	73,8	74,8	75,9	76,9	77,9	78,9	79,9	81,0	82,0	83,0
21ª	69,1	70,1	71,1	72,1	73,1	74,1	75,2	76,2	77,2	78,2	79,2	80,2	81,3	82,3	83,3
20ª	69,4	70,4	71,4	72,4	73,4	74,4	75,5	76,5	77,5	78,5	79,5	80,5	81,6	82,6	83,6
19ª	69,7	70,7	71,7	72,7	73,7	74,7	75,8	76,8	77,8	78,8	79,8	80,8	81,9	82,9	83,9
18ª	70,0	71,0	72,0	73,0	74,0	75,1	76,1	77,1	78,1	79,1	80,1	81,1	82,1	83,1	84,1
17ª	70,3	71,3	72,3	73,3	74,3	75,4	76,4	77,4	78,4	79,4	80,4	81,4	82,4	83,4	84,4
16ª	70,7	71,7	72,7	73,7	74,7	75,7	76,7	77,7	78,7	79,7	80,7	81,7	82,7	83,7	84,7
15ª	71,0	72,0	73,0	74,0	75,0	76,0	77,0	78,0	79,0	80,0	81,0	82,0	83,0	84,0	85,0
14ª	71,3	72,3	73,3	74,3	75,3	76,3	77,3	78,3	79,3	80,3	81,3	82,3	83,3	84,3	85,3
13ª	71,6	72,6	73,6	74,6	75,6	76,6	77,6	78,6	79,6	80,6	81,6	82,6	83,6	84,6	85,5
12ª	72,0	72,9	73,9	74,9	75,9	76,9	77,9	78,9	79,9	80,9	81,9	82,9	83,9	84,8	85,8
11ª	72,3	73,2	74,2	75,2	76,2	77,2	78,2	79,2	80,2	81,2	82,2	83,1	84,1	85,1	86,1
10ª	72,6	73,5	74,5	75,5	76,5	77,5	78,5	79,5	80,5	81,5	82,4	83,4	84,4	85,4	86,4
	86c	87c	88c	89c	90c	91c	92c	93c	94c	95c	96c	97c	98c	99c	100c
30ª	81,7	82,7	83,8	84,9	86,0	87,1	88,2	89,3	90,4	91,5	92,7	93,8	95	96,1	97,7
29ª	82,0	83,0	84,1	85,1	86,2	87,3	88,4	89,5	90,6	91,7	92,9	94,1	95,2	96,3	97,5
28ª	82,3	83,3	84,4	85,4	86,5	87,6	88,7	89,8	90,9	92,0	93,2	94,3	95,4	96,5	97,7
27ª	82,6	83,6	84,7	85,7	86,7	87,9	89,0	90,1	91,1	92,2	93,4	94,5	95,6	96,7	97,9
26ª	82,9	83,9	84,9	86,0	87,1	88,2	89,2	90,3	91,4	92,5	93,6	94,7	95,8	96,9	98,1
25ª	83,2	84,3	85,2	86,3	87,4	88,4	89,5	90,6	91,6	92,7	93,8	94,9	96,0	97,1	98,2
24ª	83,5	84,5	85,5	86,5	87,6	88,7	89,7	90,8	91,9	93,0	94,1	95,2	96,2	97,3	98,4
23ª	83,8	84,8	85,8	86,8	87,9	89,0	90,0	91,1	92,1	93,2	94,3	95,4	96,5	97,5	98,6
22ª	84,0	85,0	86,1	87,1	88,2	89,2	90,2	91,3	92,4	93,4	94,5	95,6	96,7	97,7	98,8
21ª	84,3	85,3	86,4	87,4	88,4	89,5	90,5	91,6	92,6	93,7	94,7	95,8	96,9	97,9	99,0
20ª	84,6	85,6	86,6	87,7	88,7	89,7	90,8	91,8	92,9	93,9	95,0	96,0	97,1	98,1	99,1
19ª	84,9	85,9	86,9	87,9	88,9	90,0	91,1	92,1	93,1	94,1	95,2	96,2	97,3	98,3	99,3
18ª	85,2	86,2	87,2	88,2	89,2	90,2	91,3	92,3	93,3	94,3	95,4	96,4	97,4	98,5	99,5
17ª	85,4	86,4	87,4	88,4	89,5	90,5	91,5	92,6	93,6	94,6	95,6	96,6	97,6	98,7	99,7
16ª	85,7	86,7	87,7	88,7	89,7	90,8	91,8	92,8	93,8	94,8	95,8	96,7	97,8	98,8	99,8
15ª	86,0	87,0	88,0	89,0	90,0	91,0	92,0	93,0	94,0	95,0	96,0	97,0	98,0	99,0	100
14ª	86,3	87,3	88,2	89,2	90,2	91,2	92,2	93,2	94,2	95,2	96,2	97,2	98,2	99,2	
13ª	86,5	87,5	88,5	89,5	90,5	91,5	92,5	93,5	94,4	95,4	96,4	97,4	98,4	99,3	
12ª	86,8	87,8	88,7	89,7	90,7	91,7	92,7	93,7	94,7	95,6	96,6	97,6	98,5	99,5	
11ª	87,1	88,0	89,0	90,0	91,0	92,0	92,9	93,9	94,9	95,8	96,8	97,8	98,7	99,7	
10ª	87,4	88,3	89,3	90,2	91,2	92,2	93,2	94,2	95,1	95,0	97,0	98,0	98,9	99,9	

Fonte: BRASIL, 2012 - Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira, 2. ed. Rev. 02.

Quadro 4 - Uvas processadas pelas empresas do Rio Grande do Sul (milhões de kg)

Fonte: IBRAVIN/ MAPA/ SEAPPA-RS Cadastro vinícola

Classif	Tipo	Safra 2004	Safra 2005	Safra 2006	Safra 2007	Safra 2008	Safra 2009	Safra 2010	Safra 2011
Americanas e híbridas	Brancas	55,27	50,10	47,16	56,62	68,79	60,60	58,50	78,8
	Rosadas	13,21	13,19	9,25	11,27	15,12	10,51	13,08	15,3
	Tintas	447,92	359,35	310,63	430,50	466,37	390,91	409,23	532,8
ComumTotal		516,40	422,64	367,04	498,38	550,29	462,02	480,82	626,9
Viníferas	Brancas	27,11	28,76	22,05	28,06	34,40	32,37	22,04	37,7
	Rosadas	0,26	0,37	0,30	0,23	0,26	0,21	0,08	0,2
	Tintas	35,22	41,48	34,24	43,86	49,09	39,53	23,95	44,7
Vinif. Total		62,59	70,61	56,60	72,15	83,75	72,10	46,07	82,7
Total Global		578,99	493,25	423,64	570,54	634,04	534,13	526,89	709,62

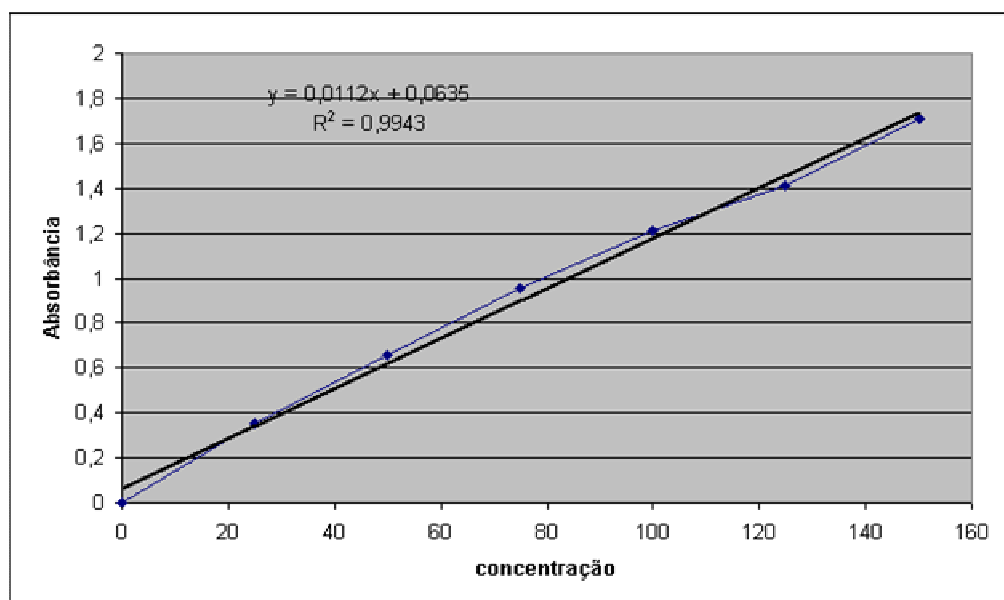
OBS:

Safra 2012: 1.455.056 toneladas no Brasil

Fonte: IBGE 2012

Curva Padrão Ácido Gálico

Abs.	Concentr.
X	y
0	0
25	0,353
50	0,656
75	0,954
100	1,214
125	1,41
150	1,711



ANEXOS

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

PARTE I

Dados de valores de **IINAB** e **IINIB** levando em consideração os Fatores Cultivar, Tipos de Método de Extração, Tipos de Resíduos, Bactéria e Concentração

1) Análise Estatística IINAB: Foi realizada Análise de Variância Fatorial (**ANOVA**) para as Variáveis Respostas valores de **IINAB** e valores de **IINIB**, através do Proc GLM do Programa SAS. Os dados apresentaram heterogeneidade de variâncias (variabilidade nos dados).

The GLM Procedure

Class Level Information		
Class	Levels	Values
CULTIVAR	3	B I M
TIPO	2	ALCOOLATURA HIDROALCOOLATURA
RESIDUO	3	CASCA ENGAÇO FOLHA
BACTERIA	4	E.coli Ent. faecalis Salmonella Sta. aureus
CONCENTRA_PERC	4	20 30 40 50

Number of Observations Read	864
Number of Observations Used	864

The GLM Procedure
Dependent Variable: VALORES_IINAB VALORES_IINAB

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	4989.093750	453.553977	221.84	<.0001
Error	852	1741.932870	2.044522		
Corrected Total	863	6731.026620			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VALORES_IINAB Mean
0.741208	41.24894	1.429868	3.466435

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
CULTIVAR	2	365.363426	182.681713	89.35	<.0001
TIPO	1	1192.390046	1192.390046	583.21	<.0001
RESIDUO	2	1711.953704	855.976852	418.67	<.0001
BACTERIA	3	151.021991	50.340664	24.62	<.0001
CONCENTRA_PERC	3	1568.364583	522.788194	255.70	<.0001

Através da Análise de Variância acima, podemos concluir que o efeito de Cultivar, Tipos de Método de Extração, Tipos de Resíduo, Bactéria e Concentração é significativo, $p < 0,0001$ para todos os fatores, em relação à variável resposta valores de **IINAB**.

2) Teste de Comparações Múltiplas de **Tukey** para comparar médias de Cultivar, Tipos de Resíduos, Bactéria e Concentração – Variável Resposta **IINAB**.

The GLM Procedure
Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey

CULTIVAR	NOTAS_IINAB LSMEAN	LSMEAN Number
B	4.37500000	1
I	3.13541667	2
M	2.88888889	3

Least Squares Means for effect CULTIVAR Pr > t for H0: LSMean(i)=LSMean(j) Dependent Variable: VALORES_IINAB			
i/j	1	2	3
1		<.0001	<.0001
2	<.0001		0.0970
3	<.0001	0.0970	

Através do Teste de Comparações Múltiplas de **Tukey**, podemos concluir, por exemplo, que o valor médio de **IINAB** do Cultivar B difere significativamente do valor médio de **IINAB** dos Cultivares I e M, $p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente.

The GLM Procedure
Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey

RESIDUO	NOTAS_IINAB LSMEAN	LSMEAN Number
CASCA	3.12152778	1
ENGAÇO	5.33680556	2
FOLHA	1.94097222	3

Least Squares Means for effect RESIDUO Pr > t for H0: LSMean(i)=LSMean(j) Dependent Variable: VALORES_IINAB			
I/j	1	2	3
1		<.0001	<.0001
2	<.0001		<.0001
3	<.0001	<.0001	

Através do Teste de Comparações Múltiplas de **Tukey**, podemos concluir, por exemplo, que o valor médio de **IINAB** do Resíduo Casca difere significativamente dos valores médios de **IINAB** dos demais Tipos de Resíduo, $p < 0,0001$.

The GLM Procedure
Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey

BACTERIA	NOTAS_IINAB LSMEAN	LSMEAN Number
E.coli	3.76388889	1
Ent. faecalis	3.60648148	2
Salmonella	3.74537037	3
Sta. aureus	2.75000000	4

Least Squares Means for effect BACTERIA Pr > t for H0: LSMean(i)=LSMean(j) Dependent Variable: VALORES_IINAB				
i/j	1	2	3	4
1		0.6623	0.9991	<.0001
2	0.6623		0.7439	<.0001
3	0.9991	0.7439		<.0001
4	<.0001	<.0001	<.0001	

Através do Teste de Comparações Múltiplas de **Tukey**, podemos concluir, por exemplo, que o valor médio de **IINAB** da Bactéria *Sta. aureus* difere significativamente do valor médio de **IINAB** da Bactéria *E. coli*, *Ent. Faecalis* e *Salmonella*, $p < 0,0001$, $p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente.

The GLM Procedure
Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey

CONCENTRA_PERC	NOTAS_IINAB LSMEAN	LSMEAN Number
20	1.35185185	1
30	3.31018519	2
40	4.29629630	3
50	4.90740741	4

Least Squares Means for effect CONCENTRA_PERC Pr > t for H0: LSMean(i)=LSMean(j) Dependent Variable: VALORES_IINAB				
i/j	1	2	3	4
1		<.0001	<.0001	<.0001
2	<.0001		<.0001	<.0001

Least Squares Means for effect CONCENTRA_PERC Pr > t for H0: LSMean(i)=LSMean(j) Dependent Variable: VALORES_IINAB				
i/j	1	2	3	4
3	<.0001	<.0001		<.0001
4	<.0001	<.0001	<.0001	

Através do Teste de Comparações Múltiplas de **Tukey**, podemos concluir, por exemplo, que o valor médio de **IINAB** da Concentração 20% difere significativamente dos valores médios de **IINAB** das demais Concentrações com $p < 0,0001$.

2) Análise Estatística - IINIB

The GLM Procedure

Number of Observations Read	864
Number of Observations Used	864

The GLM Procedure

Dependent Variable: VALORES_IINIB VALORES_IINIB

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	5409.866898	491.806082	402.16	<.0001
Error	852	1041.909722	1.222899		
Corrected Total	863	6451.776620			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	NOTAS_IINIB Mean
0.838508	28.29293	1.105848	3.908565

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
CULTIVAR	2	564.898148	282.449074	230.97	<.0001
TIPO	1	1771.028935	1771.028935	1448.22	<.0001
RESIDUO	2	2197.571759	1098.785880	898.51	<.0001
BACTERIA	3	74.781250	24.927083	20.38	<.0001
CONCENTRA_PERC	3	801.586806	267.195602	218.49	<.0001

Através da Análise de Variância acima, podemos concluir que o efeito de Cultivar, Tipos de Método de Extração, Tipos de Resíduo, Bactéria e Concentração é significativo, $p < 0,0001$, para todos os fatores, em relação à variável resposta valores de **IINIB**.

2) Teste de Comparações Múltiplas de **Tukey** para comparar médias de Cultivar, Tipos de Resíduos, Bactéria e Concentração – Variável Resposta **IINIB**.

VARIETAL	NOTAS_INIB LSMEAN	LSMEAN Number
B	4.98958333	1
I	3.69097222	2
M	3.04513889	3

Least Squares Means for effect VARIETAL Pr > t for H0: LSMean(i)=LSMean(j) Dependent Variable: NOTAS_INIB			
i/j	1	2	3
1		<.0001	<.0001
2	<.0001		<.0001
3	<.0001	<.0001	

Através do Teste de Comparações Múltiplas de **Tukey**, podemos concluir, por exemplo, que o valor médio de IINIB do Cultivar B difere significativamente do valor médio de **IINIB** dos Cultivares I e M, $p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente.

The GLM Procedure
Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey

RESIDUO	NOTAS_INIB LSMEAN	LSMEAN Number
CASCA	3.44444444	1
ENGAÇO	6.05208333	2
FOLHA	2.22916667	3

Least Squares Means for effect RESIDUO Pr > t for H0: LSMean(i)=LSMean(j) Dependent Variable: NOTAS_IINIB			
i/j	1	2	3
1		<.0001	<.0001
2	<.0001		<.0001
3	<.0001	<.0001	

Através do Teste de Comparações Múltiplas de **Tukey**, podemos concluir, por exemplo, que o valor médio de IINIB do Resíduo Casca difere significativamente dos valores médios de **IINIB** dos demais Tipos de Resíduo, $p < 0,0001$.

The GLM Procedure
Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey

BACTERIA	NOTAS_INIB LSMEAN	LSMEAN Number
E.coli	4.13425926	1
Ent. faecalis	3.99074074	2

Salmonella	4.10185185	3
Sta. aureus	3.40740741	4

Least Squares Means for effect BACTERIA
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)
Dependent Variable: NOTAS_IINIB

i/j	1	2	3	4
1		0.5321	0.9902	<.0001
2	0.5321		0.7235	<.0001
3	0.9902	0.7235		<.0001
4	<.0001	<.0001	<.0001	

Através do Teste de Comparações Múltiplas de **Tukey**, podemos concluir, por exemplo, que o valor médio de IINIB da Bactéria *Sta. aureus* difere significativamente do valor médio de **IINIB** da Bactéria *E. coli*, *Ent. Faecalis* e *Salmonella*, $p < 0,0001$, $p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente.

The GLM Procedure
Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey

CONCENTRA_PERC	NOTAS_INIB LSMEAN	LSMEAN Number
20	2.51388889	1
30	3.58333333	2
40	4.46759259	3
50	5.06944444	4

Least Squares Means for effect CONCENTRA_PERC
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)
Dependent Variable: NOTAS_IINIB

i/j	1	2	3	4
-----	---	---	---	---

Least Squares Means for effect CONCENTRA_PERC Pr > t for H0: LSMean(i)=LSMean(j) Dependent Variable: NOTAS_IINIB				
i/j	1	2	3	4
1		<.0001	<.0001	<.0001
2	<.0001		<.0001	<.0001
3	<.0001	<.0001		<.0001
4	<.0001	<.0001	<.0001	

Através do Teste de Comparações Múltiplas de **Tukey**, podemos concluir, por exemplo, que o valor médio de IINIB da Concentração 20% difere significativamente dos valores médios de **IINIB** das demais Concentrações com $p < 0,0001$.

OBS: Os programas estatísticos utilizados nas análises estatísticas foram o “Statistical Analysis System” (SAS), versão 9.2 e o “Statistical Package For The Social Sciences” (SPSS / PASWSTAT), versão 18.

PARTE II

3) Análise Estatística: Foi realizada Análise de Variância (**Anova**) de Medidas Repetidas para a Variável Resposta valores de **IINAB** através do Proc Mixed do Programa SAS.

Dependent Variable: NOTAS_IINAB NOTAS_IINAB – DADOS II 16032013, PLAN4&5

The Mixed Procedure	
Model Information	
Data Set	_PROJ_.IMPORTED40
Dependent Variable	NOTAS_IINAB
Covariance Structure	Compound Symmetry
Subject Effect	indiv

Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Satterthwaite

Class Level Information		
Class	Levels	Values
indiv	36	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36
BACT	4	E. coli Ent Sal. E Sta
SUPORTE	3	MADEIRA PANO SEM
TEMPODEEXPOSI_O	4	15' 30' 5' 60'

Number of Observations	
Number of Observations Read	144
Number of Observations Used	144
Number of Observations Not Used	0

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
BACT	3	30	3.38	0.0311
SUPORTE	2	30	111.21	<.0001
TEMPODEEXPOSI_O	3	105	72.69	<.0001

Através da Análise de Variância acima, podemos concluir que o efeito de Bactéria, Suporte e Tempo de Exposição é significativo, $p= 0,0311$, $p< 0,0001$ e $p< 0,0001$, respectivamente, em relação à variável resposta valores de **IINAB**.

4) Teste de Comparações Múltiplas de **Tukey** para comparar médias de Bactéria, Suporte e Tempo de Exposição.

Differences of Least Squares Means													
Effect	BACT	SUPORTE	TEMPO DE EXPOSIÇÃO	BACT	SUPORTE	TEMPO DE EXPOSIÇÃO	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Adjustment	Adj P
BACT	E. coli			Ent			-1.0833	0.3605	30	-3.01	0.0053	Tukey	0.0259
BACT	E. coli			Sal. E			-0.5833	0.3605	30	-1.62	0.1161	Tukey	0.3840
BACT	E. coli			Sta			-0.8611	0.3605	30	-2.39	0.0234	Tukey	0.1010
BACT	Ent			Sal. E			0.5000	0.3605	30	1.39	0.1756	Tukey	0.5169
BACT	Ent			Sta			0.2222	0.3605	30	0.62	0.5422	Tukey	0.9260
BACT	Sal. E			Sta			-0.2778	0.3605	30	-0.77	0.4470	Tukey	0.8670
SUPORTE		MADEIRA			PANO		-3.0000	0.3122	30	-9.61	<.0001	Tukey	<.0001
SUPORTE		MADEIRA			SEM		-4.5833	0.3122	30	-14.68	<.0001	Tukey	<.0001
SUPORTE		PANO			SEM		-1.5833	0.3122	30	-5.07	<.0001	Tukey	<.0001
TEMPODEEXPOS_I_O			15'			30'	-1.3889	0.4802	105	-2.89	0.0047	Tukey-Kramer	0.0237
TEMPODEEXPOS_I_O			15'			5'	3.2778	0.4802	105	6.83	<.0001	Tukey-Kramer	<.0001
TEMPODEEXPOS_I_O			15'			60'	-3.6389	0.4802	105	-7.58	<.0001	Tukey-Kramer	<.0001
TEMPODEEXPOS_I_O			30'			5'	4.6667	0.4802	105	9.72	<.0001	Tukey-Kramer	<.0001
TEMPODEEXPOS_I_O			30'			60'	-2.2500	0.4802	105	-4.69	<.0001	Tukey-Kramer	<.0001
TEMPODEEXPOS_I_O			5'			60'	-8.9167	0.4802	105	-14.40	<.0001	Tukey-Kramer	<.0001

Através do Teste de Comparações Múltiplas de **Tukey**, podemos concluir, por exemplo, que o valor médio de **IINAB** da Bactéria *E. coli* difere significativamente do valor médio de **IINAB** da Bactéria *Ent*, $p= 0,0259$. Da mesma forma, podemos concluir, por exemplo, que o valor médio de **IINAB** do Suporte Madeira difere significativamente do valor médio de **IINAB** do Suporte Pano e do Sem Suporte, com $p < 0,0001$ para ambas comparações.

OBS: Os programas estatísticos utilizados nas análises estatísticas foram o “Statistical Analysis System” (SAS), versão 9.2 e o “Statistical Package For The Social Sciences” (SPSS / PASWSTAT), versão 18.

PARTE III

5) Análise Estatística: Foi realizada Análise de **Correlação Linear de Pearson**, via Programa SPSS, entre as Variáveis Respostas valores de **IINAB**, Compostos Fenólicos de **IINAB**, valores **IINIB** e Compostos Fenólicos de **IINIB**.

Correlations

		NOTAS IINAB	C. FENÓL. IINAB	NOTAS INIB	C. FENÓL. INIB
NOTAS IINAB	Pearson Correlation	1	,779**	,877**	,779**
	Sig. (2-tailed)		,000	,000	,000
	N	72	72	72	72
C. FENÓL.IINAB	Pearson Correlation	,779**	1	,824**	1,000**
	Sig. (2-tailed)	,000		,000	,000
	N	72	72	72	72
NOTAS INIB	Pearson Correlation	,877**	,824**	1	,824**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000		,000
	N	72	72	72	72
C. FENÓL.INIB	Pearson Correlation	,779**	1,000**	,824**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	
	N	72	72	72	72

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlação: quadro acima referente ao resíduo engaçó e bactéria *Sta. aureus*

Através da Análise de Correlação Linear de Pearson, podemos concluir que existe correlação positiva entre valores de **IINAB** e os valores dos Compostos Fenólicos de **IINAB**, $p < 0,0001$, ou seja, à medida em que os valores de **IINAB** aumentam, os valores dos Compostos Fenólicos de **IINAB** também aumentam. Da mesma forma, podemos concluir que existe correlação linear positiva entre os valores de **IINIB** e os valores dos Compostos Fenólicos de **IINIB**, $p < 0,0001$, ou seja, à medida em que os valores de **IINIB** aumentam, os valores dos Compostos Fenólicos de **IINIB** também aumentam.

OBS: Os programas estatísticos utilizados nas análises estatísticas foram o “Statistical Analysis System” (SAS), versão 9.2 e o “Statistical Package For The Social Sciences” (SPSS / PASWSTAT), versão 18.

PARTE IV

6) Análise Estatística: Foi realizada **Análise de Variância Não-Paramétrica** de Kreuskal-Wallis para as Variáveis Respostas valores de **IINAB** e valores de **IINIB**.

NPar Tests

Kruskal-Wallis Test

Ranks

MATORG_BACT		N	Mean Rank
NOTAS IINAB	11	3	5,00
	12	3	2,00
	21	3	11,00
	22	3	8,00
	Total	12	

Test Statistics^{a, b}

	NOTAS IINAB
Chi-square	10,532
df	3
Asymp. Sig.	,015
Exact Sig.	,000
Point Probability	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
MATORG_BACT

Através da Análise de Variância **Não-Paramétrica** de Kruskal-Wallis, podemos concluir que existe diferença significativa entre os “Ranks” médios das Notas de **IINAB** do Fator Matorg_Bact (combinação de Material Orgânico e Bactéria), $p < 0,0001$.

NPar Tests

Kruskal-Wallis Test

Ranks

MATORG_BACT		N	Mean Rank
NOTAS IINIB	11	3	7,67
	12	3	2,33
	21	3	11,00
	22	3	5,00
	Total	12	

Test Statistics^{a, b}

	NOTAS IINIB
Chi-square	9,857
df	3
Asymp. Sig.	,020
Exact Sig.	,001
Point Probability	,001

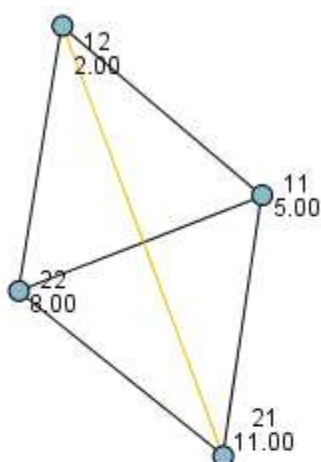
a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
MATORG_BACT

Através da Análise de Variância **Não-Paramétrica** de Kruskal-Wallis, podemos concluir que existe diferença significativa entre os “Ranks” médios das Notas de **IINIB** do Fator Matorg_Bact (combinação de Material Orgânico e Bactéria), $p=0,001$.

7) Teste de **Comparações Múltiplas de Dunn** para comparar “ranks” médios de “MATORG_BACT” - **IINAB**.

Pairwise Comparisons of ...



Each node shows the sample average rank of MATORG_BACT.

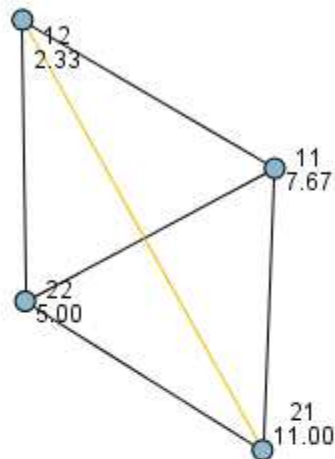
Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
12-11	3.000	2.923	1.026	.305	1.000
12-22	-6.000	2.923	-2.053	.040	.241
12-21	-9.000	2.923	-3.079	.002	.012
11-22	-3.000	2.923	-1.026	.305	1.000
11-21	-6.000	2.923	-2.053	.040	.241
22-21	3.000	2.923	1.026	.305	1.000

Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same. Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is .05.

Através do Teste de **Comparações Múltiplas de Dunn**, podemos concluir que o “Rank” médio das Notas **IINAB** da combinação ALB.S.B e *Sta. Aureus* difere significativamente do “Rank” médio das Notas de **IINAB** da combinação LEITE e *Salmonella*, $p= 0,012$.

8) Teste de Comparações Múltiplas de Dunn para comparar “ranks” médios de “MATORG_BACT” - **IINIB**.

Pairwise Comparisons of ...



Each node shows the sample average rank of MATORG_BACT.

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
12-22	-2.667	2.892	-.922	.356	1.000
12-11	5.333	2.892	1.844	.065	.391
12-21	-8.667	2.892	-2.997	.003	.016
22-11	2.667	2.892	.922	.356	1.000
22-21	6.000	2.892	2.075	.038	.228
11-21	-3.333	2.892	-1.153	.249	1.000

Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same. Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is .05.

Através do **Teste de Comparações Múltiplas de Dunn**, podemos concluir que o “Rank” médio das Notas **IINIB** da combinação ALB.S.B e *Sta. Aureus* difere significativamente do “Rank” médio das Notas de **IINIB** da combinação LEITE e *Salmonella*, $p= 0,016$.

9) Estatísticas Descritivas: Média e Desvio Padrão da Variável Resposta valor de IINAB.

The GLM Procedure

Level of Bact_	N	NOTAS_IINAB	
		Mean	Std Dev
E. coli	36	4,08333333	3,78247840
Ent	36	5,16666667	3,67617814
Sal. E	36	4,66666667	3,80225497
Sta	36	4,94444444	3,59320346

Level of Suporte_	N	NOTAS_IINAB	
		Mean	Std Dev
MADEIRA	48	2,18750000	2,09006006
PANO	48	5,18750000	3,81852288
SEM	48	6,77083333	3,40362500

Level of Tempo_Exposi__o	N	NOTAS_IINAB	
		Mean	Std Dev
15	36	4,27777778	3,39420608
30	36	5,66666667	4,00000000
5	36	1,00000000	0,00000000
60	36	7,91666667	1,57434794

OBS: Os programas estatísticos utilizados nas análises estatísticas foram o “Statistical Analysis System” (SAS), versão 9.2 e o “Statistical Package For The Social Sciences” (SPSS / PASWSTAT), versão 18.

10) Análise Estatística: Foi realizada Análise de Variância (Anova) Fatorial com 3 Fatores, Cultivar, TipoAH e Resíduo. Variável Resposta Compostos Fenólicos.

The GLM Procedure

Class Level Information		
Class	Levels	Values
CULTIVAR	3	B I M

Class Level Information		
Class	Levels	Values
TIPOAH	2	1 2
RES_DUO	3	CASCA ENGAÇO FOLHA

Number of Observations Read	54
Number of Observations Used	54

The GLM Procedure
Dependent Variable: COMP_FEN_LICOS COMP. FENÓLICOS

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	17	923255.7054	54309.1591	27104.8	<.0001
Error	36	72.1323	2.0037		
Corrected Total	53	923327.8376			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	COMP_FEN_LICOS Mean
0.999922	1.096808	1.415512	129.0574

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
CULTIVAR	2	146755.0381	73377.5191	36621.5	<.0001
TIPOAH	1	306260.1646	306260.1646	152849	<.0001
RES_DUO	2	280565.3693	140282.6846	70012.7	<.0001
CULTIVAR*RES_DUO	4	21609.9830	5402.4957	2696.29	<.0001
CULTIVAR*TIPOAH	2	62565.9559	31282.9780	15612.8	<.0001
TIPOAH*RES_DUO	2	90977.4715	45488.7357	22702.7	<.0001
CULTIV*TIPOAH*RES_DU	4	14521.7230	3630.4307	1811.89	<.0001

Através da Análise de Variância acima, podemos concluir que o efeito da interação Cultivar*TipoAH*Resíduo é significativo, $p < 0,0001$, em relação à Variável Resposta Compostos Fenólicos.

2) Teste de Comparações Múltiplas de Tukey para comparar médias da interação Cultivar*TipoAH*Resíduo.

The GLM Procedure
Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey

CULTIVAR	TIPOAH	RES_DUO	COMP_FEN_LICOS LSMEAN	LSMEAN Number
B	1	CASCA	351.000000	1
B	1	ENGAÇO	477.000000	2
B	1	FOLHA	137.000000	3
B	2	CASCA	29.600000	4
B	2	ENGAÇO	159.800000	5
B	2	FOLHA	42.200000	6
I	1	CASCA	120.266667	7
I	1	ENGAÇO	325.566667	8
I	1	FOLHA	76.300000	9
I	2	CASCA	18.333333	10
I	2	ENGAÇO	97.000000	11
I	2	FOLHA	39.900000	12
M	1	CASCA	80.400000	13
M	1	ENGAÇO	246.666667	14
M	1	FOLHA	25.100000	15
M	2	CASCA	13.800000	16
M	2	ENGAÇO	59.800000	17
M	2	FOLHA	23.300000	18

Através do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, podemos concluir, dentro do TipoAH 1 e Resíduo Casca, por exemplo, que a média de compostos fenólicos da Cultivar B difere significativamente da média de compostos fenólicos das Cultivares I e M, $p < 0,0001$. Da mesma forma, podemos concluir, dentro da Cultivar B e TipoAH 1, por exemplo, que a média de compostos fenólicos de Casca difere significativamente da média de compostos fenólicos de Engaço e Folha, $p < 0,0001$.

OBS: Os programas estatísticos utilizados nas análises estatísticas foram o “Statistical Analysis System” (SAS), versão 9.2 e o “Statistical Package For The Social Sciences” (SPSS / PASWSTAT), versão 18.