



**Extração e Quantificação de Compostos  
Fenólicos presentes no Bagaço da *Vitis vinifera L.*  
e Avaliação das suas Bioatividades**

Dissertação apresentada à  
Escola Superior de Tecnologia e Gestão  
para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química

**CARLA PATRÍCIA MACHADO PEIXOTO**

*Orientadores:*

**Professor Doutor Simão Pedro Pinho**

**Professora Doutora Isabel Cristina Ferreira**

**Professor Doutor José António Teixeira**

Bragança, 28 de Setembro de 2017

---

---

Dissertação de Mestrado apresentada à Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Bragança para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química (Decreto-Lei nº 74/2006 com as alterações introduzidas pelo Decreto-Lei nº 107/2008).

---

O conteúdo da presente Dissertação é exclusivamente da responsabilidade do autor(a):

---

(Carla Patrícia Machado Peixoto)

---

## *Agradecimentos*

A realização da presente Dissertação foi possível graças à simpatia e disponibilidade dos meus orientadores Professor Doutor Simão Pinho, Professora Doutora Isabel Ferreira e Professor Doutor José António Teixeira, aos quais manifesto os meus sinceros agradecimentos.

À Professora Doutora Isabel Ferreira, agradeço a sua disponibilidade para me receber sempre que necessário e por me dar a oportunidade de trabalhar junto da sua equipa de investigação. Ao Professor Doutor José Teixeira, agradeço também a sua disponibilidade para me receber no departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, por me ter proporcionado uma boa experiência de trabalho e bons momentos passados.

Um agradecimento enorme aos investigadores do Centro de Investigação de Montanha, Doutora Lillian Barros, Doutora Maria Inês Dias e Doutor Ricardo Calhelha, pela ajuda e excelente acompanhamento que me proporcionaram ao longo dos últimos meses. Um obrigado também à Doutora Cristina Rocha e ao Pedro Santos do Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho por toda ajuda e acompanhamento.

Um muito obrigado aos que caminharam comigo ao longo do meu percurso académico e que, com toda a certeza vão continuar a caminhar mesmo que a vida nos leve por caminhos opostos. Guardo no coração todos os momentos que partilhamos e levo-vos no coração.

Obrigado aos que estão sempre presentes e me dão força e carinho em todos os momentos da minha vida, por último, um obrigado aos “meus” pequenos mas enormes seres, Leonor, Mafalda e Diogo por sempre me presentear com um enorme sorriso e um brilho único que só as crianças sustentam, Obrigado por fazerem sempre, a minha vida mais bonita.

*A todos, um enorme e sincero Obrigado!*

---

*Dedicatória*

*Aos que me acompanham na vida e me fazem FELIZ*

---

*“Tenha em mente que tudo que você aprende na escola é trabalho de muitas gerações. Receba essa herança, honre-a, acrescente a ela e, um dia, fielmente, deposite-a nas mãos de seus filhos”*

*Albert Einstein*

---

## RESUMO

A espécie *Vitis vinifera* L. pertence à família *Vitaceae* e inclui uma grande panóplia de variedades diferentes. Durante a produção do vinho são produzidas toneladas de bagaço da uva que é essencialmente constituído por peles, sementes e hastes das uvas. Estes componentes, nomeadamente as sementes, são ricas em compostos fenólicos que possuem diversas e excelentes atividades biológicas tais como antioxidante, antitumoral, cardioprotetora e antimicrobiana.

Neste trabalho, foram avaliadas a atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana das diferentes partes do bagaço da uva e os resultados obtidos evidenciaram que, de todas as diferentes partes constituintes do bagaço da uva, as sementes são uma melhor fonte de compostos fenólicos com propriedades bioativas.

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes no bagaço foram realizadas usando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detetores de dióxido e de espectrometria de massa, revelando que o composto presente em maior quantidade nas peles é o hexósido do ácido *p*-cumárico, enquanto que nas sementes e mistura do bagaço os compostos presentes em maior quantidade são derivados da (epi)catequina.

A otimização do processo de extração dos compostos fenólicos indicou a combinação etanol:água 50:50 v/v como o melhor solvente e, para uma extração máxima de fenólicos são requeridas temperaturas entre os 75 °C a 85 °C por tempos compreendidos entre 60 a 90 minutos.

Os resultados dos ensaios de extração usando um solvente verde, o lactato de etilo, indicaram que este é um bom solvente extrativo, podendo ser usado a temperaturas mais elevadas usando tempos de extração menores.

**Palavras-chave:** *Vitis vinifera* L., compostos fenólicos, bioatividades, extração, identificação, quantificação, solventes verdes.

---

## ABSTRACT

*Vitis vinifera* L. species belongs to the family *Vitaceae*, which includes several varieties. During wine production tons of grape pomace are produced comprising essentially the skins, seeds and stems of grapes. These parts namely the seeds, are rich in phenolic compounds which in turn present diverse and biological properties such as antioxidant, antitumoral, cardio protective and antimicrobial.

In this study, *in vitro* antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities of the different constituents of grape pomace were evaluated. The results demonstrated that the seeds are the best source of phenolic compounds with bioactive properties.

The identification and quantification of phenolic compounds present in grape pomace was carried out by high performance liquid chromatography coupled with diode array and mass spectrometry detectors, revealing that *p*-coumaric acid hexoside is the most abundant compound in the skins extract, while derivatives of (epi)catechin are the major ones in the extracts of seeds and grape pomace mixture.

The optimization process of the extraction of phenolic compounds indicated the mixture ethanol:water 50:50 v//v as the best solvent, for the maximum recovery of phenolic compounds, temperatures between 75 °C and 85 °C are required, while the times for extraction are between 60 and 90 minutes.

The results of the extractions using ethyl lactate indicated that it is a good solvent of extraction that can be used at high temperatures for lower times of extraction.

**Keywords:** *Vitis vinifera* L, phenolic compounds, bioactivities, extraction, identification, quantification, green solvents.

---

## ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
ÍNDICE GERAL.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
ÍNDICE DE TABELAS.....	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Importância e Motivação do Estudo.....	1
1.2 Objetivos do Estudo.....	2
2. ESTADO DA ARTE.....	3
2.1. <i>Vitis vinifera</i> L.....	3
2.2 Bagaço da Uva.....	4
2.3 Composição de Compostos Fenólicos no Bagaço da Uva.....	5
2.4 Compostos Fenólicos.....	6
2.5 Bioatividades dos Compostos Fenólicos Presentes nas Uvas.....	8
2.5.1. Atividade Antioxidante.....	8
2.5.1.1 Métodos Aplicados na Avaliação da Atividade Antioxidante.....	9
2.5.1.2 Atividade Antioxidante de <i>Vitis vinifera</i> L.....	12
2.5.2 Atividade Citotóxica.....	12
2.5.2.1 Métodos Aplicados na Avaliação da Atividade Citotóxica.....	12
2.5.2.2 Atividade Citotóxica e Potencial Antitumoral de <i>Vitis vinifera</i> L.....	13
2.5.3 Atividade Antimicrobiana.....	14
2.5.3.1 Métodos Aplicados na Avaliação da Atividade Antimicrobiana.....	14
2.5.3.2 Atividade Antimicrobiana de <i>Vitis vinifera</i> L.....	14
2.6 Análise de Compostos Fenólicos.....	15

---

2.6.1	Extração de Compostos Fenólicos.....	16
2.6.2	Identificação e Quantificação de Compostos Fenólicos.....	18
2.7.	Otimização do Processo de Extração.....	19
2.8	Extração com Solventes Verdes .....	21
3.	COMPONENTE EXPERIMENTAL.....	23
3.1.	Avaliação das Bioatividades, Identificação e Quantificação de Compostos Fenólicos .....	23
3.1.1	Procedimento de Extração para Avaliação das Bioatividades.....	24
3.1.2	Avaliação da Atividade Antioxidante.....	24
3.1.3	Avaliação da Atividade Citotóxica.....	26
3.1.4	Avaliação da Atividade Antimicrobiana .....	28
3.1.5	Análise de Compostos Fenólicos e Antocianinas.....	29
3.1.5.1	Ácidos Fenólicos e Flavonóides .....	29
3.1.5.2	Antocianinas .....	30
3.2.	Otimização do Processo de Extração.....	31
3.2.1.	Solvente de Extração .....	32
3.2.2.	Processo de Extração .....	32
3.2.3	Otimização do Tempo e Temperatura de Extração .....	33
3.3	Extração com Lactato de Etilo.....	34
3.4	Análise Estatística.....	34
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
4.1	Bioatividades .....	36
4.2	Identificação e Quantificação dos Compostos Fenólicos .....	42
4.3	Otimização do Processo de Extração.....	48
4.3.1	Solvente de Extração .....	48
4.3.2	Tempo e Temperatura de Extração.....	49
4.4	Extração com Lactato de Etilo.....	58

---

5. CONCLUSÕES .....	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62
7. ANEXOS .....	70

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> (1) Bagaço da uva liofilizado; (2) Sementes da uva; (3) Mistura de peles e hastes da uva.....	4
<b>Figura 2:</b> Estrutura básica e sistema de numeração de flavonóides [Fonte: Bravo, 1998].....	6
<b>Figura 3:</b> Forma radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH [Fonte: Alves <i>et al.</i> , 2010].9	
<b>Figura 4:</b> Estrutura do $\beta$ -caroteno (A) e do ácido linoleico (B) [Fonte: Alves <i>et al.</i> , 2010].....	10
<b>Figura 5:</b> Redução do Fe(III) a Fe(II) pela adição de um antioxidante [Fonte: Huang <i>et al.</i> , 2005].....	10
<b>Figura 6:</b> Reação do malonaldeído com o ácido tiobarbitúrico [Fonte: Borges <i>et al.</i> , 2011].....	11
<b>Figura 7:</b> Reação do radical ABTS com um antioxidante [Fonte: Vasconcelos <i>et al.</i> , 2007].....	11
<b>Figura 8:</b> Reação de esterificação reversível na produção de lactato de etilo [Fonte: Leng Kua <i>et al.</i> , 2016].....	22
<b>Figura 9:</b> Teor de fenóis totais presentes no extrato MU na presença de vários solventes. ....	48
<b>Figura 10:</b> Gráficos de superfície e pareto, para a variável fenóis totais obtidos a partir dos extratos a) MU, b) SU e c) PHU sob diferentes condições de tempo e temperatura. L e Q correspondem aos efeitos linear e quadrático, respetivamente. ....	52
<b>Figura 11:</b> Teor de Fenóis totais obtidos para cada extrato a 79 e 120 °C. ....	53
<b>Figura 12:</b> Teor de Fenóis totais obtidos a 79 °C durante 60, 120 e 180 minutos para os extratos em estudo. ....	54
<b>Figura 13:</b> Gráficos de superfície obtidos tendo como variável de resposta o poder antioxidante pelos métodos ABTS e FRAP obtidos para os três extratos: a) MU, b) SU e c) PHU. ....	56
<b>Figura 14:</b> Teor de fenóis totais obtidos nas extrações com lactato de etilo, a 79 e 120 °C. ....	58
<b>Figura A.1:</b> Cromatograma de HPLC obtidos a 280 nm (A) e 370 nm (B) relativos ao perfil fenólico dos extratos hidrometanólicos da mistura do bagaço da uva (MU).....	84

---

<b>Figura A.2:</b> Cromatograma de HPLC obtidos a 280 nm (A) e 370 nm (B) relativos ao perfil fenólico dos extratos hidrometanólicos de sementes do bagaço da uva (SU). ....	85
<b>Figura A.3:</b> Cromatograma de HPLC obtidos a 280 nm (A) e 370 nm (B) relativos ao perfil fenólico dos extratos hidrometanólicos de peles do bagaço da uva (PHU).....	86

---

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Compostos fenólicos presentes nas uvas e nas suas diferentes partes de acordo com Xia <i>et al.</i> , (2010).....	5
<b>Tabela 2:</b> Subgrupos e estruturas químicas dos compostos fenólicos presentes nas uvas e vinho [Fonte: Fontana <i>et al.</i> , 2013].....	7
<b>Tabela 3:</b> Bioatividades de alguns compostos fenólicos presentes nas uvas [Fonte: Xia <i>et al.</i> , 2010].....	8
<b>Tabela 4:</b> Condições de extração do desenho experimental .....	34
<b>Tabela 5:</b> Atividade antioxidante dos extratos hidrometanólicos presentes no bagaço da uva (média ± DP).....	36
<b>Tabela 6:</b> Atividade antitumoral e citotóxica dos extratos hidrometanólicos presentes no bagaço da uva (média ± DP).....	38
<b>Tabela 7:</b> Atividade antimicrobiana dos extratos hidrometanólicos presentes no bagaço da uva (média ± DP).....	40
<b>Tabela 8:</b> Tempo de retenção (Rt), comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ), dados espectrais de massa, tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos (não-antocianínicos e antocianínicos) em extratos hidrometanólicos de sementes, peles e mistura do bagaço da uva.....	45
<b>Tabela 9:</b> Teor de fenóis totais (média±DP) presentes nos extratos em estudo. ....	49
<b>Tabela 10:</b> Equações do modelo quadrático tendo como variável de resposta o teor de fenóis em função das variáveis do processo, Temperatura (°C) e tempo (min) e, respectivos coeficientes de determinação.....	50
<b>Tabela 11:</b> Atividade antioxidante pelo método DPPH: valores de EC <sub>50</sub> obtidos (média±DP) para os extratos em estudo. ....	57
<b>Tabela 12:</b> Teor de fenóis totais obtidos (média±DP) nas extrações com lactato de etilo a 120 °C, durante 60 e 120 minutos.....	59
<b>Tabela B.1:</b> Rendimento de extração, valores de EC <sub>50</sub> e teor de fenóis totais obtidos no ensaio a 30 °C usando os vários solventes em estudo. ....	74
<b>Tabela B.2:</b> Rendimento de extração, valores de EC <sub>50</sub> e teor de fenóis totais obtidos no ensaio a 50 °C usando os vários solventes em estudo.....	74

---

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Importância e Motivação do Estudo

O consumo diário de frutas é fundamental para uma alimentação saudável e equilibrada. Muitas das frutas, como acontece por exemplo com as uvas, são uma importante fonte de hidratos de carbono, vitaminas, sais minerais e outros compostos fitoquímicos.

Estudos recentes comprovam a importância da atividade biológica dos compostos fenólicos presentes nas uvas e nas suas diferentes componentes como a pele, sementes e hastes. As uvas, principalmente as escuras, possuem diversas propriedades bioativas já descritas na literatura. Compostos fenólicos como as antocianinas, flavanóis, flavonóis, estilbenos e ácidos fenólicos que estão presentes nas diferentes partes da uva, apresentam benefícios significativos para a saúde humana, pois previnem algumas doenças degenerativas e são também considerados conservantes, evitando a oxidação dos alimentos.

Localizada no Nordeste de Portugal, a região do Vale do Douro tem uma longa tradição vinícola produzindo vinho desde tempos imemoriais. A região Vinhateira do Douro estende-se por diversos concelhos entre eles, Alijó, um pequeno concelho do distrito de Vila Real.

A Adega Cooperativa de Alijó deu início à sua atividade em 1960 sendo no momento, uma das cooperativas com maior desempenho sócio-económico da região do Douro. O seu reconhecimento deve-se à excelente qualidade dos vinhos produzidos, com especial destaque para os Reservas o Moscatel e os Espumantes.

Devido à grande abundância como matéria-prima na região onde se insere o Instituto Politécnico de Bragança (IPB), que resulta da elevada quantidade de vinho produzida, é de grande interesse avaliar as propriedades químicas e biológicas do bagaço da uva, bem como encontrar processos de extração e purificação que contribuam de modo eficiente e sustentado para acrescentar valor a esse resíduo da indústria vitivinícola.

---

## 1.2 Objetivos do Estudo

Devido à grande importância das propriedades biológicas dos compostos fenólicos presentes nas uvas e apesar da grande diversidade de estudos já publicados na área (por exemplo, Fontana *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2010; Naczek e Shahidi., 2004; Murthy *et al.*, 2002; Bartolomé *et al.*, 2004) é de fundamental interesse fazerem-se estudos análogos, usando as matérias-primas produzidas na região de Trás-Os-Montes e Alto Douro.

Assim, o objetivo deste estudo centra-se na avaliação das bioatividades do bagaço das uvas, na identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes e na otimização do seu processo de extração.

Durante a evolução da presente dissertação, dadas as boas condições de trabalho e a necessidade de promover o uso de solventes não-convencionais foi proposto realizar a extração com recurso a líquidos iónicos. Porém, devido à elevada quantidade de solvente necessária e aos custos monetários associados, foi explorada uma outra alternativa, como seja o uso de um solvente verde.

Tendo em conta as diferentes propriedades químicas por comparação a outros solventes orgânicos usados na extração de compostos fenólicos, foi escolhido o lactato de etilo. Desta forma, foi acrescentado mais um objetivo ao presente estudo: a avaliação do comportamento do lactato de etilo como solvente de extração, comparando-o ao desempenho do solvente testado na otimização da extração.

---

## 2. ESTADO DA ARTE

### 2.1. *Vitis vinifera* L.

Durante as antigas civilizações, Grega e Romana, as uvas foram reverenciadas pelo seu uso na vinificação. Hoje em dia existem três principais grupos de uva, uvas Europeias (*Vitis vinifera*), uvas Norte-Americanas (*Vitis labrusca* e *Vitis rotundifolia*) e uvas híbridas francesas (Xia *et al.*, 2010).

A espécie *Vitis vinifera* L. pertence à família *Vitaceae* que inclui cerca de 60 espécies *Vitis* distribuídas pela Ásia, América do Norte e Europa sob condições climáticas subtropicais, mediterrânicas e continentais temperadas. É a única espécie de *Vitis* que adquiriu interesse económico significativo, algumas das outras espécies como *Vitis rupestris*, *Vitis riparia* ou *Vitis berlandieri* são utilizados como enxertos de reprodução devido à sua resistência contra patogénicos (Terral *et al.*, 2010).

Existem diversas variedades da *Vitis Vinifera* L., desde as uvas brancas (*Chardonnay*, *White Riesling*, *Pinot blanc*, *Pinot gris*, *Gewürztraminer*, *Muscat Ottonel*, *Sauvignon blanc*, *Comtessa*, *Noblessa*, *Semillon*, *Morio Muscat*, *Siegerrebe*) às uvas vermelhas (*Pinot noir*, *Pinot Meunier*, *Cabernet Sauvignon*, *Cabernet franc*, *Merlot*, *Limberger*, *Gamay noir*, *Trollinger* e *Petit Verdot*) (Rodríguez Montealegre *et al.* 2006; Santos-Buelga *et al.* 1995). Porém, as variedades de vinho tinto nacionais mais produzidas na região do Douro, designam-se de Touriga Nacional, Touriga França, Tinto Cão, Tinta Barroca e Tinta Roriz.

A uva da videira *Vitis vinifera* L. é uma das maiores culturas frutícolas do mundo que apresenta uma produção anual próxima de 58 milhões de toneladas (Murthy *et al.*, 2002). As uvas são ricas em compostos fenólicos sendo que, aproximadamente 75% dos polifenóis existentes se encontram na pele e sementes. Durante o processamento das uvas são produzidas toneladas de bagaço de uva e as sementes constituem uma proporção considerável delas, totalizando 38-52% em relação à matéria seca (Ghafoor, *et al.*, 2009).

---

## 2.2 Bagaço da Uva

A uva é uma das frutas mais cultivadas a nível mundial e cerca de 80% da colheita, destina-se apenas à fabricação de vinhos e seus derivados, gerando assim elevadas quantidades de resíduos especialmente borras e bagaço (Gruz *et al.*, 2013). A reutilização do bagaço da uva como suplemento dietético nutricional ou ingrediente funcional, proporciona uma alternativa sustentável ao tratamento de resíduos, promovendo assim o desenvolvimento sustentável (Charalampia e Koutelidakis, 2016).

O bagaço da uva (**Figura 1**) é um subproduto da indústria vinícola, constituído principalmente por peles, sementes e hastes representando assim, cerca de 20-25% do peso da uva esmagada para a produção do vinho. A semente da uva é rica em ácidos fenólicos, flavonóides, procianidinas e resveratrol, enquanto que as peles são mais abundantes em antocianinas (Yu e Ahmedna, 2013).

Nos últimos anos, não só os subprodutos da vinificação mas também os resíduos agrícolas de origem vegetal têm despertado uma atenção considerável como potenciais fontes de fenólicos bioativos, que podem ser utilizados para vários fins na indústria farmacêutica, cosmética e alimentar (Makris *et al.*, 2007). A composição de polifenóis de cada parte da uva presente no bagaço varia dependendo das variedades da uva e é influenciada pela localização, clima, maturidade e tempo de fermentação, não sendo naturalmente fácil de generalizar (Yu e Ahmedna, 2013; Xia *et al.* 2013).

O bagaço da uva húmido é um material extremamente perecível sujeito à deterioração microbiana descontrolada, devido ao seu alto teor de humidade e à atividade da água. Assim, o processo de desidratação é um passo fundamental na extensão da vida útil da matéria-prima e na manutenção das suas propriedades nativas antes da utilização para diferentes propósitos (Planinic *et al.*, 2015).



**Figura 1: (1) Bagaço da uva liofilizado; (2) Sementes da uva; (3) Mistura de peles e hastes da uva.**

### 2.3 Composição de Compostos Fenólicos no Bagaço da Uva

Os compostos fenólicos mais comuns no bagaço são as antocianinas, catequinas, procianidinas, ácidos fenólicos e estilbenos (Spencer *et al.*, 2008). Por sua vez, a uva da *Vitis vinifera* L. é rica em compostos fenólicos, estando estes distribuídos principalmente nas peles, hastes, folhas e sementes da uva, ao invés da sua parte succulenta interior (**Tabela 1**) (Xia *et al.*, 2010).

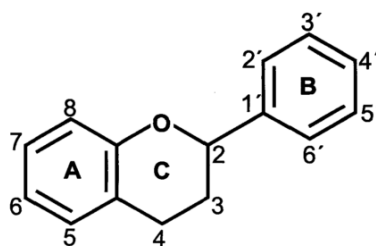
A quantidade média de compostos fenólicos presentes na uva é de 50-490 mg/100g sendo que no vinho tinto é de 1000-4000 mg/dm<sup>3</sup>, maior do que no vinho branco que é somente 200-300 mg/dm<sup>3</sup> (Bravo, 1998). Um estudo realizado nas uvas *muscadine*, cinco de pele roxa e cinco de pele branca, cultivadas no sul da Geórgia, estado dos Estados Unidos da América refere que, a concentração total de compostos fenólicos nas sementes, peles, carne e folha é de 2178.8, 374.6, 23.8 e 351.6 mg/g<sub>GAE</sub> (equivalente de ácido gálico), respetivamente (Pastrana-Bonilla *et al.*, 2003). Além da maturidade do fruto, as condições ambientais como por exemplo o estado da água da videira tem sido associado a diferenças nos polifenóis nas uvas, uma vez que influencia o crescimento dos frutos que, por sua vez influencia a concentração de fenólicos totais e os atributos sensoriais do vinho (Kennedy *et al.*, 2000).

**Tabela 1: Compostos fenólicos presentes nas uvas e nas suas diferentes partes de acordo com Xia *et al.*, (2010).**

Fonte	Compostos Fenólicos
Semente	Ácido gálico, (+)-catequina, epicatequina, dímero de procianidina, proantocianidinas
Pele	Proantocianidinas, ácido elágico, quercetina, miricetina, canferol
Folha	Miricetina, ácido elágico, canferol, quercetina, ácido gálico
Haste	Rutina, trans-resveratrol, quercetina 3- <i>O</i> -glucuronídeo
Uva seca	Ácido hidroxicinâmico, hidroximetilfurfural
Vinho tinto	Catequina, quercetina, resveratrol, ácido hidroxicinâmico, malvidina-3- <i>O</i> -glucósido, peonidina-3- <i>O</i> -glucósido, cianidina-3- <i>O</i> -glucósido, petunidina-3- <i>O</i> -glucósido

## 2.4 Compostos Fenólicos

A estrutura básica de um flavonóide (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) (**Figura 2**) contém 15 átomos de carbono dispostos em três anéis que são legendados como A, B e C. Os flavonóides são divididos em seis subgrupos: flavonas, flavanóis, flavonóis, flavanonas, isoflavonas e antocianinas, de acordo com o estado de oxidação do anel C central (Dai e Mumper, 2010). As propriedades biológicas dos flavonóides estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre determinado meio.



**Figura 2: Estrutura básica e sistema de numeração de flavonóides**  
[Fonte: Bravo, 1998].

Os compostos fenólicos nas uvas e vinhos podem, em geral ser classificados em três principais grupos: ácidos fenólicos, flavonóides e taninos (Fontana *et al.*, 2013).

Os ácidos fenólicos dividem-se em ácidos hidroxibenzoicos (derivados do ácido benzoico) e ácidos hidroxicinâmicos (derivados do ácido cinâmico). Os flavonóides podem se dividir em flavanóis, flavonóis, estilbenos e antocianinas e por último, os taninos que se podem dividir em hidrolisáveis e condensados ou proantocianidinas.

As quatro maiores classes de polifenóis encontrados em alimentos são os ácidos fenólicos, flavonóides, lignanos e estilbenos (Dai e Mumper, 2010; Yu e Ahmedna, 2013).

Na **Tabela 2** são indicados os subgrupos e estruturas químicas dos principais constituintes fenólicos presentes nas uvas e no vinho.

**Tabela 2: Subgrupos e estruturas químicas dos compostos fenólicos presentes nas uvas e vinho**  
 [Fonte: Fontana *et al.*, 2013].

Compostos Fenólicos	Estrutura Química	Compostos
Ácidos hidroxibenzoícos		Ácido gálico Ácido siríngico Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoíco Ácido protocatepânico
Ácidos hidroxicinâmicos		Ácido caféico Ácido <i>p</i> -cumárico Ácido ferúlico Ácido sinápico Ácido caftárico Ácido coutárico
Flavanóis		Catequina Epicatequina Epicatequina galato
Flavonóis		Canferol Quercetina Canferol 3- <i>O</i> -glucósido Quercetina 3- <i>O</i> -glucósido Quercetina 3- <i>O</i> -galactósido Quercetina 3- <i>O</i> -glucurónido Quercetina 3- <i>O</i> -ramnose Rutina
Estilbenos		Trans-resveratrol
Antocianinas		Cianidina Peonidina Delfinidina Petunidina Malvidina

---

## 2.5 Bioatividades dos Compostos Fenólicos Presentes nas Uvas

O interesse na investigação de componentes ativos, especialmente compostos fenólicos, presentes em fontes naturais como frutas e vegetais tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (Ghafoor *et al.*, 2009). A razão deste aumento deve-se ao benefício das atividades biológicas para a saúde humana, como por exemplo, as propriedades antioxidantes, cardioprotetoras, antitumorais, anti-inflamatórias, antimicrobianas e anti-envelhecimento (**Tabela 3**) (Xia *et al.*, 2010). De seguida, descrever-se-á algumas das atividades de maior relevância para a matéria-prima em estudo.

**Tabela 3: Bioatividades de alguns compostos fenólicos presentes nas uvas [Fonte: Xia *et al.*, 2010].**

Compostos Fenólicos	Bioatividade
Resveratrol	Eliminação de radicais livres Aumenta o nível de óxido nítrico do plasma Regulação do metabolismo lipídico
Quercetina	Antibacteriana Aumenta o nível de óxido nítrico do plasma
Catequina	Antitumoral Eliminação de radicais livres Antibacteriana
Procianidina	Anti-inflamatória Antitumoral Eliminação de radicais livres Anti-inflamatória
Ácido gálico	Antioxidante Eliminação de radicais livres
Epicatequina	Antibacteriana

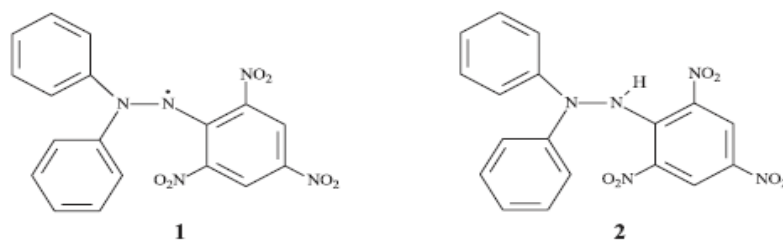
### 2.5.1. Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante é provavelmente a bioatividade mais notável dos compostos fenólicos presentes no bagaço da uva (Yu e Ahmedna, 2013). Um antioxidante pode ser definido como “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparada com a de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação desse substrato” (Young e Woodside, 2014). A principal classe de compostos com atividade antioxidante são as vitaminas (vitaminas C e E), os carotenóides

(carotenos e xantofilas) e os polifenóis (flavonóides, ácidos fenólicos, lignanos e estilbenos) (Oroian e Escriche, 2015).

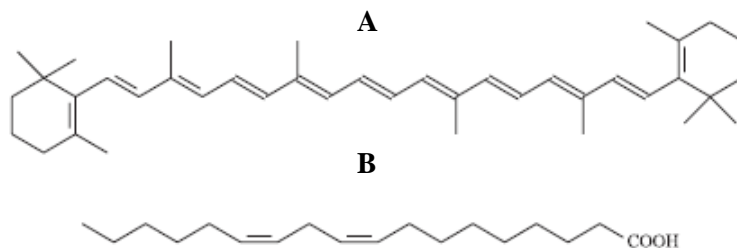
### 2.5.1.1 Métodos Aplicados na Avaliação da Atividade Antioxidante

São vários os métodos usados para avaliar a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos extraídos das uvas e das suas diferentes componentes, bem como de outros resíduos agro-alimentares (Xia *et al.*, 2010). Os testes antioxidantes em alimentos podem ser classificados em dois grupos: os ensaios usados para avaliar a peroxidação lipídica, no qual um lípido ou substrato lipoproteico sob condições padrão é usado e o grau de inibição da oxidação medido, e os ensaios usados para medir a habilidade de sequestro de radicais livres (Alves *et al.*, 2010; Fontana *et al.*, 2013). O método de captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) baseia-se na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH reduzindo-o a hidrazina (**Figura 3**). Quando uma determinada substância que age como dador de átomos de hidrogénio é adicionada a uma solução de DPPH a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido (Alves *et al.*, 2010). A avaliação da atividade antioxidante dá-se através da monitorização do consumo do radical livre DPPH por medição das absorvâncias a um comprimento de onda entre 515-517 nm. A percentagem de atividade antioxidante (AA%) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada de concentração eficiente (EC<sub>50</sub>). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será o valor de EC<sub>50</sub> e maior será a sua atividade antioxidante (Borges *et al.*, 2011).



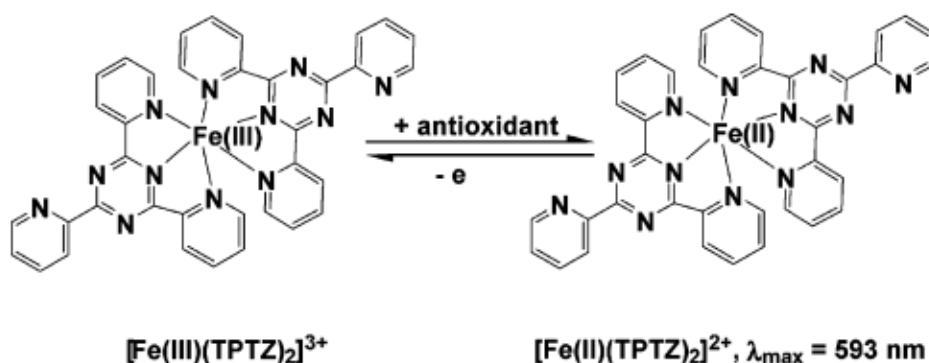
**Figura 3: Forma radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH**  
[Fonte: Alves *et al.*, 2010].

Quanto ao método da auto-oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, este permite avaliar a capacidade de uma determinada substância prevenir a oxidação do  $\beta$ -caroteno, protegendo-o dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (**Figura 4**). A reação pode ser monitorada espectrofotometricamente pela perda da coloração do  $\beta$ -caroteno a um comprimento de onda de 470 nm, com leitura imediata e em intervalos de 15 min, por um tempo total de 2 horas (Alves *et al.*, 2010).



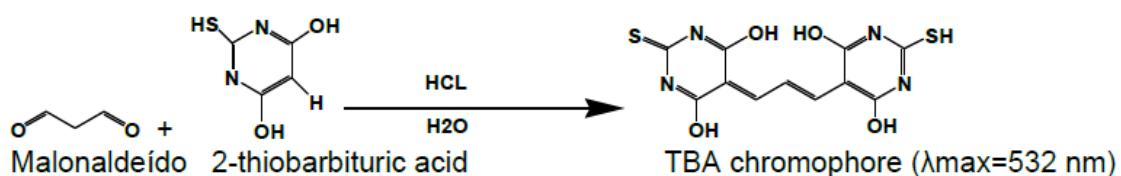
**Figura 4:** Estrutura do  $\beta$ -caroteno (A) e do ácido linoleico (B)  
[Fonte: Alves *et al.*, 2010].

Entre outros métodos utilizados, pode ainda nomear-se o método FRAP (capacidade de redução férrica do plasma) que se baseia na capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras reduzirem o  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  (**Figura 5**). Essa capacidade pode ser avaliada pela monitorização da formação do complexo  $\text{Fe}^{2+}$  - TPTZ (ferroso-tripiridiltriazina) que apresenta cor azul intensa e pode ser medido espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 593 nm (Vasconcelos *et al.*, 2007).



**Figura 5:** Redução do  $\text{Fe(III)}$  a  $\text{Fe(II)}$  pela adição de um antioxidante  
[Fonte: Huang *et al.*, 2005].

O método de inibição da peroxidação lipídica através do ensaio das espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) é um método empregue na avaliação da peroxidação lipídica. Baseia-se na reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos. Um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malonaldeído (MDA), que apresenta coloração rosada sob aquecimento, podendo ser acompanhada pela medição da absorvância a 532 nm (**Figura 6**). A oxidação é inibida com a adição de um antioxidante, tendo como resultado uma diminuição da absorvância (Alves *et al.*, 2010).



**Figura 6:** Reação do malonaldeído com o ácido tiobarbitúrico  
[Fonte: Borges *et al.*, 2011].

A atividade antioxidante pode ainda ser medida através dos métodos ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfonato) e ORAC (capacidade de absorvância do radical de oxigénio) (Xia *et al.*, 2010). O método ABTS é também um método colorimétrico quem relaciona a habilidade dos antioxidantes em neutralizar o radical ABTS [sal de amónio do ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfonato)]. O radical apresenta absorvância característica a 515 nm e absorções secundárias a 660, 734 e 820 nm. O ABTS apresenta cor verde e quando adicionado a um meio contendo antioxidantes permite avaliar através do grau de descoloração a sua capacidade antioxidante (**Figura 7**) (Borges *et al.*, 2011; Vasconcelos *et al.*, 2007; Miller, *et al.*, 1993).



**Figura 7:** Reação do radical ABTS com um antioxidante  
[Fonte: Vasconcelos *et al.*, 2007].

---

### **2.5.1.2 Atividade Antioxidante de *Vitis vinifera* L.**

Segundo Xia *et al.* (2010) através do método ABTS, usando os extratos das diferentes partes da uva, a maior capacidade antioxidante foi encontrado nas sementes, seguidas da pele e a carne que apresentaram menor capacidade antioxidante, 281,3  $\mu\text{mol}_{\text{TE}}/\text{g}$ , 12,8  $\mu\text{mol}_{\text{TE}}/\text{g}$ , e 2,4  $\mu\text{mol}_{\text{TE}}/\text{g}$  respectivamente. Por seu lado, Murthy *et al.* (2002) estudaram a atividade antioxidante do bagaço da uva *Vitis vinifera* e constataram que usando o método do radical DPPH, os extratos do bagaço da uva dissolvidos em metanol mostraram máxima atividade entre os restantes extratos dissolvidos em acetato de etilo e água, 87,1, 76, e 21,7% de atividade antioxidante. Alguns autores têm tentado descobrir quais os compostos fenólicos e estrutura química responsáveis pelas atividades antioxidantes de extractos de uva, tendo concluído que, a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos tende para um limite de saturação de concentração e acima desse limite a atividade não aumenta ainda mais com a concentração (Dani *et al.*, 2009).

### **2.5.2 Atividade Citotóxica**

A citotoxicidade é considerada como o potencial que um composto tem para inibir o crescimento celular e eventualmente, induzir a morte celular. A maioria dos testes *in vitro* de avaliação de citotoxicidade medem a necrose (morte celular) no entanto, outro mecanismo de morte celular designado de apoptose (morte celular geneticamente programada), pode ser avaliado requerendo métodos diferentes de análise (Eisenbrand *et al.*, 2002).

#### **2.5.2.1 Métodos Aplicados na Avaliação da Atividade Citotóxica**

Os testes de citotoxicidade *in vitro* são úteis para definir a capacidade intrínseca de um composto causar a morte celular e também para definir a gama de concentração para ensaios *in vitro* adicionais e mais detalhados (Eisenbrand *et al.*, 2002). Um indicador de toxicidade é o crescimento celular alterado e o efeito dos produtos químicos sobre a capacidade de replicação das células. A concentração da substância em que 50% das células não se multiplicam, é designada de dose inibitória ( $\text{ID}_{50}$ ) (Ekwall *et al.*, 1990) ou também de  $\text{GI}_{50}$  concentração de amostra que inibiu 50% do crescimento celular líquido (Dias *et al.*, 2013).

---

A reprodução celular pode ser medida através de vários métodos incluindo a contagem de células, ADN, teor de proteína ou atividade enzimática. Outro índice de toxicidade é a viabilidade celular medida utilizando corantes vitais, tais como o azul tripano que só entra em células mortas ou, o vermelho neutro que é activado quando tomado por células vivas (Ekwall *et al.*, 1990).

O ensaio de sulforodamina B (SRB) é um dos métodos mais utilizados para avaliação da citotoxicidade *in vitro*. O ensaio baseia-se na capacidade do SRB ligar-se a componentes de proteínas de células, que foram fixadas em placas de cultura de tecidos pelo ácido tricloroacético (TCA). SRB é um corante amino-xanteno de coloração rosa brilhante, com dois grupos sulfónicos que se ligam a resíduos de aminoácidos básicos, sob condições ácidas suaves e dissociam em condições básicas. Como a ligação do SRB é estequiométrica, a quantidade de corante extraída é proporcional à massa de células. Este método tem sido usado em testes de toxicidade de drogas contra diferentes tipos de linhas celulares cancerosas e não cancerosas (Vichai e Kirtikara, 2006).

#### **2.5.2.2 Atividade Citotóxica e Potencial Antitumoral de *Vitis vinifera* L.**

As atividades anticancerígenas dos polifenóis podem ser explicadas por diversos mecanismos. Vários polifenóis inibem a activação de NF-KB (complexo proteico que desempenha funções como fator de transcrição) provavelmente através do disparo de um sinal redox sensível nas células. A inibição de tais fatores de transcrição por polifenóis pode desempenhar um papel essencial na prevenção de cancros (Scalbert *et al.*, 2005).

Os polifenóis podem induzir apoptose de células tumorais e portanto, reduzir o crescimento de tumores (Scalbert *et al.*, 2005). Os extractos ricos em antocianinas derivadas do bagaço da uva e várias antocianidinas puras exibem efeitos pró-apoptóticos em vários tipos de células (Wang e Stoner, 2008). Um estudo realizado por Gee *et al.*, (2002), sobre a supressão da proliferação celular de criptas intestinais por quercetina em ratos onde aplicaram quercetina exposta a células de rato, concluíram que a quercetina inibe a proliferação de células cancerígenas gástricas e colónicas (côlon) *in vitro*, suprimindo a mitose e aumentando a apoptose. Também foi relatado por Yu e Ahmedna (2013) que os fenóis presentes nas sementes e na pele da uva inibem algumas proteases, tais como a elastase de leucócito e gelatinases, associadas à inflamação e invasão do cancro.

---

### **2.5.3 Atividade Antimicrobiana**

Devido às preocupações ambientais e com a saúde relacionadas com o uso de compostos antimicrobianos de origem sintética, o interesse em obter esses compostos a partir de fontes naturais, como frutas e vegetais tem aumentado consideravelmente (Fontana *et al.*, 2013). A atividade microbiana é uma causa primária da deterioração de muitos alimentos e é muitas vezes responsável pela perda de qualidade e segurança dos alimentos (Nirmala e Narendhirakannan, 2011). Muitos dos extractos fenólicos presentes em plantas exibem atividade antimicrobiana contra estirpes específicas de bactérias tais como, o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli* (Yu e Ahmedna, 2013).

#### **2.5.3.1 Métodos Aplicados na Avaliação da Atividade Antimicrobiana**

Os métodos de avaliação da concentração inibitória mínima (MIC) podem ser divididos em grupos tais como difusão, diluição, impedância e métodos de densidade óptica (Lambert *et al.*, 2001). Os métodos mais usados são provavelmente o método da difusão em ágar por disco e o da microdiluição em caldo (Bona *et al.*, 2014). A MIC é definida como “a menor concentração que resultou na manutenção ou redução da viabilidade do inóculo” (Carson *et al.*, 1995). A determinação da MIC envolve um procedimento de teste semi-quantitativo que dá uma aproximação à menor concentração de um antimicrobiano necessário para prevenir o crescimento microbiano (Lambert e Pearson, 2000).

#### **2.5.3.2 Atividade Antimicrobiana de *Vitis vinifera* L.**

Junge *et al.* (2005) reportaram que o resveratrol, presente na pele da uva apresenta fortes atividades antifúngicas e antibacterianas. Os fungos considerados sensíveis ao resveratrol incluem os patogénicos humanos (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Trichosporon beigeli*). Ainda, Thimothe *et al.* (2007) estudaram a composição química e a atividade biológica de fenólicos obtidos de várias variedades de uvas de vinho tinto e os seus extratos de bagaço sobre a patogenicidade do *Streptococcus mutans*. Observaram que a atividade biológica do bagaço foi tão eficaz quanto (ou significativamente melhor) do que os extratos de uva inteiras.

---

## 2.6 Análise de Compostos Fenólicos

O processo utilizado no processamento do vinho tem uma grande influência sobre o tipo e o nível de compostos fenólicos nos vinhos (Yilmaz e Toledo, 2004). Estes são considerados metabolitos secundários que são sintetizados pelas plantas durante o seu desenvolvimento normal (Naczk e Shahidi, 2004). Nas plantas, os fenólicos podem atuar como fitoalexinas, antioxidantes, agentes protectores contra radiação UV e contribuem para a pigmentação da planta, enquanto que nos alimentos, os fenólicos são responsáveis pelo sabor, odor, amargura, astringência, cor e estabilidade oxidativa dos produtos (Naczk e Shahidi, 2004).

Entre os ácidos fenólicos, os ácidos hidroxicinâmicos como o ácido ferúlico, sinápico, cafeico e o *p*-cumárico são os mais amplamente distribuídos nas plantas e grãos (Karakaya, 2004). Os flavonóides são geralmente classificados como fenólicos ou polifenóis devido à sua estrutura química. Pequenas diferenças na estrutura química alteram o espectro ultra violeta (UV) dos flavonóides tornando mais fácil a sua diferenciação e quantificação numa amostra. Entre as frutas, as uvas e os seus componentes são boas fontes de flavonóides dietéticos (Yilmaz e Toledo, 2004).

A cor do vinho tinto deve-se principalmente às antocianinas, derivadas do fruto e pigmentos poliméricos formados a partir de antocianinas por condensação com outros compostos flavonóides (Bakker *et al.*, 1986). Os polifenóis presentes nas uvas, as antocianinas e proantocianidinas desempenham um papel importante na cor, astringência e estabilidade dos vinhos tinto. As proantocianidinas, são também conhecidas como taninos condensados e estão presentes nas peles da uva e sementes, como procianidinas e prodelfinidinas (Yilmaz & Toledo, 2004a). As antocianinas, flavonóides e resveratrol são os principais componentes funcionais responsáveis pela maioria das atividades biológicas das uvas (Xia *et al.*, 2010).

Um dos métodos comumente usados para determinar o teor de fenólicos totais é o método colorimétrico do reagente Folin-Ciocalteu (FCR) modificado por Singleton e Rossi (1965) que atua sobre os fenóis devido às suas propriedades redutoras. Os resultados são expressos em miligramas de ácido gálico por grama de extrato ( $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{extrato}}$ ) (Lorrain *et al.*, 2013; Bozan *et al.*, 2008).

---

## 2.6.1 Extração de Compostos Fenólicos

O objetivo do processo de extração deve centrar-se numa recuperação máxima de compostos e na sua elevada qualidade (concentração e poder antioxidante) (Spigno *et al.*, 2007).

A extração de compostos fenólicos em materiais vegetais é influenciada pela sua natureza química, pelo método de extração utilizado, pelo tamanho da partícula da amostra, pelo tempo e condições de armazenamento bem como pela presença de substâncias interferentes (Naczk & Shahidi, 2004). A classificação dos compostos fenólicos para fins nutricionais, distingue também os polifenóis extraíveis que se designam de polifenóis de baixa massa molecular e podem ser extraídos com água, metanol, etanol, éter etílico, acetato de etilo e acetona em solução aquosa, dos polifenóis não extraíveis, que são os polifenóis de alto peso molecular ou fenóis ligados a fibras ou proteínas dietéticas que permanecem insolúveis nos solventes usuais (Bravo, 1998; Bonilla *et al.* 1999; Naczk e Shahidi 2004).

A extração sólido-líquido é a técnica mais comum para extração de polifenóis do bagaço e baseia-se na migração dos analitos contidos numa matriz sólida para o solvente que está em contacto com essa mesma matriz (Fontana *et al.*, 2013). A extração por solventes pode ser melhorada aumentando a temperatura dos solventes, pois temperaturas mais altas costumam favorecer a extração, sendo o coeficiente de difusão maior (Oroian e Escriche, 2015).

Com o passar dos anos, foram propostas novas técnicas para a extração de fenólicos do bagaço da uva, das quais se destaca a extração por fluídos supercríticos (SCF). Esta emprega as propriedades únicas de fluídos supercríticos para facilitar a extração de analitos orgânicos de amostras sólidas, aumentando assim a sua adaptabilidade como solventes para processos de extração (fluídos supercríticos são fluídos que acima da sua temperatura crítica e pressão, têm geralmente um bom poder solvente, alta difusividade e baixa viscosidade) (Fontana *et al.* 2013; Oroian e Escriche 2015; Dai e Mumper, 2010). Um método semelhante é a extração acelerada de solventes, também conhecida como extração de fluido pressurizado ou extração de líquido pressurizado (PLE), que utiliza solventes convencionais a altas temperaturas e pressões para melhorar a extração de analitos orgânicos a partir de amostras sólidas (Fontana *et al.*, 2013). Outros métodos como a extração assistida por microondas (MAE), extração assistida por ultra-som (UAE), a extração subcrítica da água (SWE), extração por descargas eléctricas de alta

---

tensão (HVED), extração a alta pressão hidroestática (HHP) e extração assistida por enzimas (EAE) podem ainda ser empregues, eliminando ou reduzindo o uso de solventes orgânicos, que em grandes quantidades são prejudiciais à saúde (Xia *et al.* 2013; Oroian e Escriche 2015; Dai e Mumper, 2010).

Ghafoor *et al.* (2009) realizaram um estudo sobre a otimização da extração por ultrassom de compostos fenólicos e antocianinas das sementes da *Vitis vinifera*. As melhores condições para a extração máxima total de compostos fenólicos (5,44 mg<sub>GAE</sub>/100mL) incluem 53,15% de etanol, uma temperatura de 56,03 °C e um tempo de 29,03 min. Para a extração máxima total de antocianinas (2,28 mg/mL), 52,35% de etanol, uma temperatura de 55,13 °C e um tempo de 29,49 min.

Usando técnicas recentes de extração, num estudo realizado por Ju e Howard (2003) utilizaram a extração líquida pressurizada para extrair antocianinas de peles de uva vermelha seca, concluindo que a PLE a altas temperaturas (80-100 °C), usando água acidificada (0,1% de HCl em água desionizada) foi tão eficaz na extração de antocianinas de peles de uva, como o metanol acidificado a 60% (0,1% HCl em 60% metanol). Um outro estudo que compara as técnicas de extração de polifenóis totais e flavonóides presentes nas sementes e peles da *Vitis vinifera* L. var. *Pinot Noir* fornecidos por uma empresa localizada em Trentino (norte de Itália), foi realizado por Casazza *et al.* (2010). Os autores observaram que a extração a alta temperatura e pressão num reactor Parr (modelo 350 M, série 4650) foi a mais eficiente, a concentração de polifenóis totais nas sementes e pele foi de 108,3 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>DW</sub> e 34,2 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>DW</sub> (miligramas de ácido gálico equivalente por grama de resíduo seco) respetivamente e de flavonóis nas sementes e pele foi de 47,2 mg<sub>CE</sub>/g<sub>DW</sub> e 21,6 mg<sub>CE</sub>/g<sub>DW</sub> (miligramas de catequina equivalente por grama de resíduo seco).

Em suma, a aplicação de métodos convencionais de extração tem a vantagem de ser acessível para a maioria dos laboratórios com recuperações satisfatórias quando os parâmetros de extração são otimizados com sucesso. Contudo, estão condicionados a determinadas restrições, como por exemplo o sobreaquecimento do material vegetal, o que pode produzir uma perda de atividade e uma fraca estabilidade do produto final, bem como o elevado consumo de energia e solventes orgânicos (Fontana *et al.*, 2013).

---

### 2.6.2 Identificação e Quantificação de Compostos Fenólicos

Os materiais vegetais podem conter compostos fenólicos simples (ácidos fenólicos e antocianinas) bem como substâncias altamente polimerizadas (taninos) em diferentes quantidades (Dai & Mumper, 2010).

Foram desenvolvidos vários métodos espectrofotométricos para a quantificação de compostos fenólicos. Estes métodos baseiam-se em diferentes princípios e são utilizados para determinar vários grupos estruturais presentes nos compostos fenólicos. A cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) são amplamente utilizadas tanto para a separação como para identificação de compostos fenólicos. A elucidação da estrutura é muitas vezes obtida utilizando a combinação de GC e HPLC com análise espectrométrica de massa (MS) (Naczek e Shahidi, 2004). No HPLC, o sistema solvente consiste numa fase aquosa e numa fase orgânica (principalmente metanol ou acetonitrilo) que são misturadas isocraticamente ou num gradiente. Geralmente, se o sistema estiver acoplado a um detetor MS, adiciona-se um ácido (acético e fórmico são os mais comuns) aos solventes em concentrações que variam de 0,1 a 10% para obter uma boa forma do pico, mas também para melhorar a ionização por eletropulverização (ESI) (Fontana *et al.*, 2013).

Várias fases móveis estão disponíveis no HPLC para a análise das antocianinas, procianidinas, flavononas, flavonóis, ácidos fenólicos e flavanóis. A introdução de colunas de fase reversa aumentou consideravelmente a separação por HPLC de diferentes classes de compostos fenólicos (Naczek & Shahidi, 2004).

A fim de investigar o teor de antocianinas em extratos da uva *Vitis vinifera*, um estudo realizado por Kallithraka *et al.* (2005) concluiu que a quantidade de antocianinas presentes variam entre 85,7 e 1914,0 mg/kg de massa fresca, sendo a média de 731,7 mg/kg. Um estudo similar foi desenvolvido por Rodriguez Montealegre *et al.* (2006) que avaliaram a quantidade de compostos fenólicos presentes nas peles e sementes de dez variedades da uva *Vitis vinifera* cultivadas em clima quente. O estudo foi monitorizado em HPLC e os resultados mostraram que as peles continham ésteres tartáricos de ácidos hidroxicinâmicos (6-45 mg/kg de uva), flavanóis monoméricos e diméricos (9-96 mg/kg) e flavonóis (25-197 mg/kg), enquanto que, os compostos presentes nas sementes compreendiam quase exclusivamente aos flavanóis com concentrações entre 330-1390 mg/kg. Identicamente ao estudo anterior, Yilmaz e

---

Toledo (2004) avaliaram as diferenças entre os principais flavanóis monoméricos e ácidos fenólicos nas sementes e peles das uvas da *Vitis vinifera* variedade *Chardonnay* e *Merlot* e nas sementes da uva *Vitis rotundifolia* variedade *Muscadine*. Concentrações de ácido gálico, catequina monomérica e epicatequina foram determinadas 99, 12 e 96 mg/100g<sub>resíduo seco</sub> nas sementes da *Muscadine*, 15, 358 e 421 mg/100g<sub>resíduo seco</sub> nas sementes *Chardonnay* e 10, 127 e 115 mg/100g<sub>resíduo seco</sub> nas sementes *Merlot* respetivamente.

## 2.7. Otimização do Processo de Extração

A extração tem como principal objetivo a obtenção de determinados componentes desejados retidos numa dada matriz (Pinelo *et al.*, 2005). A extração de polifenóis depende da sua difusão para o solvente usado na extração. Deste modo, na literatura é usual informar diversas condições de extração como o tempo, solvente, temperatura, rácio sólido/líquido e tamanho das partículas, de acordo com a acessibilidade dos polifenóis nas diferentes matrizes. Uma vez que os fenóis são altamente reativos, as condições de extração podem alterar profundamente o perfil fenólico do extrato (Mané *et al.*, 2007; Pinelo *et al.*, 2005).

O ajuste das condições de extração é geralmente realizado através da otimização sucessiva dos principais parâmetros que influenciam a eficiência da extração, sem levar em conta as eventuais interações entre eles. A solubilidade dos compostos fenólicos é determinada pela natureza química da amostra vegetal, bem como pela polaridade do solvente utilizado (Mané *et al.*, 2007).

O tipo de solvente tem sido um factor de investigação importante. O acetato de etilo foi relatado como um dos melhores solventes para extração de polifenóis de sementes de uva (é capaz de extrair selectivamente proantocianidinas) e a adição de água até um certo nível aumenta o rendimento de extração (devido ao aumento da permeabilidade de sementes de uva). Por outro lado, solventes alcoólicos têm sido comumente empregados na extração de fenólicos a partir de materiais vegetais, aumentando assim, o rendimento do extrato bruto. Em particular, misturas de álcoois e água revelaram ser mais eficientes na extração comparado com o sistema de solvente monocomponente (Spigno *et al.*, 2007). Solventes como o metanol, etanol, acetona, acetato de etilo em combinação com

---

água, têm sido amplamente utilizados para a extração de fenóis a partir de materiais vegetais (Dai e Mumper, 2010; Naczek e Shahidi, 2004).

A comparação entre metanol e etanol usado em extracções realizada por Yilmaz e Toledo (2004) relata que é preferível o uso do etanol tendo em vista uma aplicação alimentar dos extratos.

O tempo e a temperatura de extração são também parâmetros importantes a serem otimizados, não só pela recuperação máxima de compostos, mas também para minimizar o custo de energia do processo.

Muitos autores concordam com o facto de que o aumento da temperatura favorece a extração, aumentando não só o coeficiente de difusão mas também a solubilidade do soluto, mas notando que acima de um determinado valor limite os compostos podem ser desnaturados (Spigno *et al.*, 2007; Yilmaz e Toledo, 2004). Longos tempos de extração e temperaturas altas aumentam a possibilidade de oxidação dos fenóis que, por sua vez, diminui o rendimento dos fenóis nos extratos. Por exemplo, para a extração de antocianinas são usadas temperaturas entre os 20 e 50 °C, pois, temperaturas acima dos 70 °C causam uma rápida degradação das antocianinas (Dai & Mumper, 2010). Em relação aos tempos de extração, estes normalmente variam de 1 min a 24 h. Tempos de extração mais longos aumentam a possibilidade de oxidação de compostos fenólicos a não ser que sejam adicionados agentes redutores ao sistema solvente (Naczek e Shahidi, 2004).

Spigno *et al.*, (2007) estudaram a otimização do processo de extração de compostos fenólicos a partir do bagaço da uva, investigando o tempo de extração (1 a 24 h), a temperatura (45<sup>o</sup> e 60 °C) e o efeito do solvente (etanol com diferentes teores de água), sobre o rendimento de fenóis e a qualidade dos extratos (concentração e poder antioxidante). Os resultados mostraram que os rendimentos de extração foram maiores a 60 °C do que a 45 °C, com aparente degradação térmica além das 20 h. O rendimento de fenóis aumentou para o teor de água do etanol de 10% para 30% e manteve-se constante para o teor de água de 30% a 60%, enquanto a concentração de extratos de fenóis diminuiu para o teor de água acima de 50%. O poder antioxidante (método ABTS) foi altamente correlacionado com a concentração total de fenóis e não foi influenciado pelo teor de água do etanol, sugerindo que esta variável influenciou apenas a quantidade mas não a natureza dos compostos extraídos. Ballesteros *et al.* (2014) estudaram as condições de extração e solventes (etanol, água, metanol e acetona) para

---

uma máxima recuperação de compostos fenólicos antioxidantes presentes no café *Silverskin* concluindo que a melhor condição de extração para uma máxima recuperação de compostos fenólicos, foi alcançado quando usado como solvente o etanol a 60% (v/v) num rácio de 1g<sub>café</sub>:35 mL durante 30 min a uma temperatura entre os 60-65°C. Ao contrário de Guerrero *et al.* (2008), que estudaram a extração etanólica e aquosa de polifenóis a partir do bagaço destilado da uva *Vitis vinifera* var. *Albariño* e verificaram que o rendimento de polifenóis em extração aquosa foram mais elevados (até 30 vezes mais) do que o da extração etanólica.

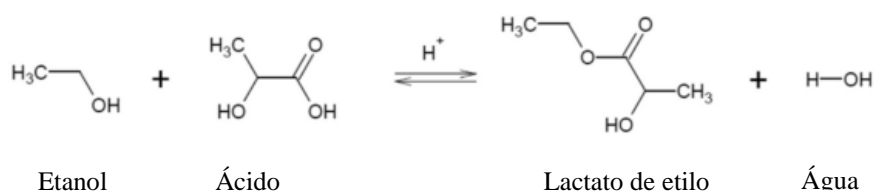
## 2.8 Extração com Solventes Verdes

Devido às preocupações relacionadas com a segurança alimentar e o impacto ambiental das tecnologias de extração de solventes, é importante explorar outras vertentes ou seja, explorar novos solventes que sejam verdes, eficientes e seguros para posterior consumo dos extratos por humanos (Leng Kua *et al.*, 2016).

Os solventes verdes são conhecidos como bio-solventes, uma vez que apresentam baixa toxicidade, baixa miscibilidade em água, são biodegradáveis, apresentam ponto de ebulição alto e são de fácil recuperação (Sin *et al.*, 2017). Recentemente, os solventes à base de biomassa têm sido usados em diversos estudos devido às suas propriedades únicas como a não toxicidade, reciclagem, segurança e a sua produção a partir de matérias-primas renováveis que os tornam solventes económicos (Paul *et al.*, 2016).

O lactato de etilo (2-hidroxiopropanoato de etilo) de fórmula molecular C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>, apresenta-se no estado líquido de cor clara amarelado e pode ser facilmente encontrado em pequenas quantidades em diversos alimentos, incluindo vinhos, frango e algumas frutas (Pereira, *et al.*, 2011). É o principal membro da família de ésteres de lactato e embora muito poucos estudos relatem a sua síntese, a sua forma de produção é bastante interessante e demonstra claramente que é um solvente verde comparado aos solventes à base de petróleo. É sintetizado a partir de uma reação de esterificação entre o ácido láctico e o etanol (**Figura 8**) e o seu ponto de ebulição é de 151-155 °C, podendo desta forma substituir os solventes orgânicos de baixo ponto de ebulição. Apresenta também um bom poder de solvência, baixa pressão de vapor e baixa tensão superficial (Paul *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2011).

O lactato de etilo é geralmente classificado como solvente polar capaz de formar uma ligação de hidrogénio intra e intermolecular quer como dador ou receptor de protões. Em suma, o lactato de etilo pode dissolver substâncias polares e não polares sendo capaz de extrair compostos com uma ampla gama de polaridade. Este solvente é usado em indústrias de síntese orgânica, fragâncias, tintas e revestimentos, bem como removedor de tinta, removedor de graffiti, agente de limpeza e como fonte de monómero para o fabrico de um polímero biodegradável PLA (ácido poliláctico) (Leng Kua *et al.*, 2016).



**Figura 8: Reação de esterificação reversível na produção de lactato de etilo**  
[Fonte: Leng Kua *et al.*, 2016].

---

### 3. COMPONENTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Avaliação das Bioatividades, Identificação e Quantificação de Compostos Fenólicos

Os ensaios da avaliação das bioatividades bem como a identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos da *Vitis vinifera* L., foram realizados na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.

Todos os procedimentos e métodos de avaliação foram seguidos de acordo com os procedimentos desenvolvidos pela equipa de investigação em que se insere este trabalho.

##### *Caracterização das amostras*

O bagaço da uva em estudo foi fornecido pela cooperativa de Alijó. Segundo os dados do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), Alijó ainda que do distrito de Vila Real já se encontra na fronteira com o distrito de Braga e é uma área com uma orografia bastante relevante. Por este facto, e também pela melhor disponibilidade dos dados, os dados relativos à radiação global total (RG\_TOT) foram recolhidos de uma estação meteorológica situada em Cabeceiras de Basto, e os dados relativos à quantidade de precipitação (PR\_QTD) foram recolhidos de uma estação meteorológica situada em Cabril. Alijó tem um clima quente e temperado, durante o ano de 2016 foi registado uma radiação total de 5674925.7 kJ/m<sup>2</sup> sendo a média por dia cerca de 15547.7 kJ/m<sup>2</sup>. Julho foi o mês mais quente do ano com uma radiação média diária de 27255.3 kJ/m<sup>2</sup>. Relativamente à quantidade de precipitação, foram registados em 2016 cerca de 2253.5 mm, sendo a média por dia cerca de 6.17 mm. Janeiro foi o mês com maior quantidade de precipitação, com uma média de 19.1 mm.

Após a separação manual das diferentes partes da uva (peles, sementes e hastes) estas foram liofilizadas. A liofilização é um método de secagem eficaz para subprodutos onde o material não é exposto a altas temperaturas resultando na preservação das propriedades organolépticas e nutritivas dos produtos, sendo um processo fundamental no pré-tratamento das amostras do bagaço da uva (Planinic *et al.*, 2015). A liofilização foi realizada a uma temperatura de -47 °C e pressão 0.01 mbar durante cerca de 5 dias num liofilizador FreeZone 4.5 model 7750031, Labconco, KS, USA. Após liofilização procedeu-se à caracterização das amostras sendo a mistura de peles sementes e hastes

---

designada de MU, as sementes da uva designada de SU e por último, a mistura peles e hastes (não sendo a separação entre as peles e as hastes possível devido às pequenas dimensões das hastes) designada de PHU.

### 3.1.1 Procedimento de Extração para Avaliação das Bioatividades

Às amostras secas (1g) foi adicionado 30 mL de solução metanol:água (80:20 v/v). A extração foi realizada com recurso a agitação a 150 rpm durante 1 h, e de seguida, filtrada por papel Whatman N° 4. Aos resíduos adicionou-se novamente 30 mL de metanol:água (80:20 v/v) de forma a executar uma nova extração durante 1 h nas mesmas condições. Os extratos combinados foram evaporados a 40 °C num evaporador rotativo para a extração do metanol presente nas amostras.

### 3.1.2 Avaliação da Atividade Antioxidante

Para a avaliação da atividade antioxidante, os extratos em solução de concentração 20 mg/mL foram submetidos a sucessivas diluições de 20 mg/mL a 0.039 mg/mL.

A atividade captadora de radicais DPPH foi monitorizada utilizando um leitor de microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc.). De todas as diluições das amostras previamente preparadas, foram colocados 30 µL nos diferentes poços de uma microplaca de 96 poços e de seguida, adicionou-se 270 µL de solução de DPPH de concentração  $6 \times 10^{-5}$  mol/L. As placas foram colocadas no escuro durante 1 h e a absorvância foi medida a 515 nm. A atividade captadora do radical (ACR) foi calculada como percentagem de descoloração da solução DPPH utilizando a equação:

$$\% \text{ ACR} = [(Abs_{DPPH} - Abs_s) / Abs_{DPPH}] \times 100 \quad [1]$$

Onde,  $Abs_{DPPH}$  corresponde à absorvância da solução de DPPH e  $Abs_s$  à absorvância da solução de DPPH na presença da amostra. O valor de  $EC_{50}$  (concentração de amostra responsável pela captação de 50% de radicais DPPH) foi calculado por interpolação gráfica da percentagem de ACR em função da concentração da amostra.

Na avaliação do poder redutor, os antioxidantes presentes nas amostras em estudo vão reduzir o  $Fe^{3+}$ /ferrocianeto que apresenta cor amarela à forma ferrosa/ $Fe^{2+}$ , verificando-se assim a alteração da cor para diferentes tons de verde.

Foram colocados 500 µL das diferentes concentrações das amostras em três eppendorfs, de seguida adicionaram-se 500 µL de tampão fosfato de sódio (200 mol/L, pH 6.6) e

---

500 µL de ferrocianeto de potássio (1% w/v). Todos os eppendorfs foram submetidos a sucessivas diluições e incubados a 50 °C durante 20 min. Após incubação, adicionaram-se 500 µL de ácido tricloroacético para parar a reação e desta mistura foram retirados 800 µL para uma placa de 46 poços, contendo previamente 800 µL de água destilada e 160 µL de solução cloreto de ferro. A atividade foi monitorizada por um leitor de microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc.) e a absorvância lida a 690 nm, sendo a concentração de extrato com 0.5 de absorvância (EC<sub>50</sub>) calculada a partir do gráfico de absorvância a 690 nm em função da concentração do extrato.

Quando auto-oxidados pela luz, calor ou radicais livres, os carotenóides podem sofrer uma rápida descoloração. De modo a inibir a descoloração do β-caroteno, adiciona-se antioxidantes individuais ou extratos naturais, uma vez que estes têm a capacidade de ceder átomos de hidrogénio aos radicais, prevenindo assim a descoloração do β-caroteno.

Preparou-se por dissolução uma solução de β-caroteno (2 mg) em clorofórmio (10 mL). Transferiu-se 2 mL desta solução para um balão de fundo redondo e evaporou-se a 40 °C num evaporador rotativo para a remoção do clorofórmio. De seguida, adicionaram-se 40 mg de ácido linoleico, 400 mg de emulsionante Tween 80 e 100 mL de água destilada, agitando-se vigorosamente. Transferiu-se 4.8 mL desta emulsão para tubos de ensaio contendo 200 µL das diferentes concentrações dos extratos. Mediu-se a absorvância a 470 nm e incubaram-se os tubos em banho-maria a 50 °C sob agitação. Após 2 h de incubação, mediu-se novamente a absorvância. A inibição da descoloração do β-caroteno foi calculada utilizando a equação:

$$\% \text{ Descoloração} = [(Abs_{470nm} \text{ após } 2h / Abs_{470nm} \text{ inicial}) \times 100] \quad [2]$$

A concentração de extrato que origina 50% de atividade antioxidante (EC<sub>50</sub>) foi calculada por interpolação a partir do gráfico de percentagem da inibição da descoloração do β-caroteno em função da concentração de extrato.

Após oxidação de um substrato lipídico, o malonaldeído (MDA) de coloração rosa formado por clivagem dos ácidos gordos insaturados pode ser medido a 532 nm. Como substrato lipídico foi usado um tecido cerebral de porco. Ao tecido adicionou-se tampão

---

Tris-HCl (20 mM, pH 7.4) numa proporção 1:2 (w/v) a mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada a 3000 rpm durante 10 min. Preparou-se eppendorfs com 200 µL de diferentes concentrações de extrato e de seguida adicionou-se 100 µL de ácido ascórbico, 100 µL de sulfato de ferro, 100 µL do sobrenadante do homogeneizado cerebral e incubou-se a 37.5 °C durante 1h. Posteriormente, adicionou-se 500 µL de ácido tricloroacético para parar a reação (28% w/v) e 380 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (2% w/v) colocando-se novamente a incubar a 80 °C durante 20 min. Após incubação, centrifugou-se a 3000 rpm durante 5 min com o objetivo de remover as proteínas precipitadas. Por fim, mediu-se a intensidade da cor do complexo MDA-TBA do sobrenadante a 532 nm. A percentagem de inibição da peroxidação lipídica (%) foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Inibição} = [(A - B)/A] \times 100 \quad [3]$$

Em que *A* e *B* correspondem à absorvância do branco e da amostra, respetivamente. A concentração de extrato que fornece 50% de inibição da peroxidação lipídica (EC<sub>50</sub>) foi calculada a partir do gráfico da percentagem de inibição da formação de TBARS em função da concentração de extrato.

### **3.1.3 Avaliação da Atividade Citotóxica**

Para a avaliação da atividade antitumoral utilizaram-se quatro linhas celulares tumorais humanas, HeLa (carcinoma cervical), MCF-7 (carcinoma da mama), NCI-H460 (carcinoma do pulmão) e HepG2 (carcinoma do fígado).

As células foram mantidas como culturas de células aderentes em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado pelo calor e 2 mM glutamina (células MCF-7) ou meio DMEM suplementado com 10% SFB, 2 mM de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomina (células HeLa, HepG2 e NCI-H460) numa incubadora humidificada a 37 °C, numa atmosfera com 5% CO<sub>2</sub>. Para a avaliação da hepatotoxicidade, possibilidade de danificar as células hepáticas não tumorais, foi utilizada uma cultura de células primárias a partir de fígado fresco de porco (PLP2) obtido num matadouro local,

---

mantida em meio DMEM suplementado com 10% SFB, 2 mM de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina.

Todas as experiências foram realizadas em ambiente asséptico numa câmara de fluxo laminar vertical de classe II (TLStar, AV-30/70, Espanha). O procedimento seguido é o descrito por Vichai e Kirtikara (2006).

### ***Preparação dos extratos***

Os extratos hidrometanólicos foram dissolvidos em água desionizada estéril de modo a obter-se uma concentração de 8000 µg/mL. Transferiu-se 10 µL deste preparo para uma placa de 96 poços previamente identificada e efectuaram-se sucessivas diluições usando para cada uma das concentrações de extrato até 125 µg/mL.

### ***Tratamento das células***

Inicialmente removeu-se o meio das caixas de cultura de células e adicionou-se 2 mL de solução tampão fosfato-salino (PBS) para lavar as células. Removeu-se a solução PBS e adicionou-se 2,5 mL de solução HBSS (a quantidade deve cobrir uniformemente a superfície do crescimento celular na caixa) para que as células se desagreguem. Para que a tripsina seja eficaz colocou-se a caixa na estufa a 37 °C durante 5 min. O desagregamento das células foi visualizado através de um microscópio invertido (Nicon Eclipse Ts 100). De seguida transferiu-se a suspensão celular para um tubo de 15 mL e levou-se à centrífuga a 1200 rpm durante 5 min. Retiraram-se 75 µL de suspensão para um eppendorf e adicionaram-se 75 µL de solução de azul tripano para contagem do número de células numa câmara de Neubauer. As células são viáveis e estão aptas para se proceder às avaliações seguintes se o corante não penetrar na membrana das células, ou seja, se estas se mantiverem na sua cor original, incolor.

### ***Exposição das células aos extratos em estudo***

Assim que as células estão aptas para proceder à medição da atividade, estas foram então colocadas numa placa de 96 poços a uma densidade adequada ao ensaio (10.000 células/poço;  $V_{total}$  200 µL) contendo previamente 10 µL das diferentes concentrações de extrato preparadas. Deste modo, as concentrações finais de extrato em cada poço serão 400 µg/mL, 100 µg/mL, 25 µg/mL, e 6.25 µg/mL. As placas foram colocadas na

---

incubadora humidificada a 37 °C, numa atmosfera com 5% CO<sub>2</sub> durante 48 h. Este procedimento foi realizado em todas as linhas celulares tumorais e não tumorais.

#### ***Fixação celular e coloração***

Após as 48 h, retirou-se as placas da incubadora e adicionaram-se 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) com o objetivo de inibir a reação. Colocaram-se as placas no frio a 4 °C durante 1 h. Após 1 h, as soluções foram descartadas e lavaram-se as placas cuidadosamente com água corrente da torneira e deixou-se secar na estufa até completa secura. Após secagem completa das placas, adicionou-se solução corante sulforodamina B (SRB) (1% ácido acético + 0.6% de sulfato de amina) de coloração rosa e deixou-se repousar durante 30 min à temperatura ambiente. Após os 30 min, descartou-se as soluções e lavou-se as placas com ácido acético 1% para remoção do corante não ligado.

#### ***Medição da densidade óptica***

Por fim, adicionaram-se 112 µL de solução Tris base 10 mM com o intuito de lisar as células e conseqüentemente libertar as proteínas coradas com SRB. Agitaram-se as placas e leu-se as absorvâncias a 515 nm num leitor de microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc.). Como padrão foi utilizada a ellipticina. Os resultados foram expressos em valores de GI<sub>50</sub> (concentração de amostra responsável por 50% de inibição de crescimento celular).

### **3.1.4 Avaliação da Atividade Antimicrobiana**

As culturas das bactérias em estudo foram *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, (crescidas em meio soja tripticaseína, TSB), *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA), *Staphylococcus aureus* susceptível à metilicina (MSSA), e *Morganella murganiform*. (crescidas em meio Müller-Hinton, MH). Para as bactérias *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* foram estudadas duas estirpes, uma proveniente do CHATMAD (Centro Hospital de Trás-os-Montes e Alto Douro) e outra proveniente do ULSNE (Unidade Local de Saúde do Nordeste).

Foram preparadas as concentrações de extrato de 100 mg/mL em água desionizada estéril. De seguida, preparou-se os meios agar MH e TSB com os extratos em tubos

---

esterilizados de 15 mL, de forma a obter-se uma concentração de 20 mg/mL. Foi colocada uma pequena massa de bactéria num tubo de ensaio contendo aproximadamente 2 mL de água desionizada estéril e mediu-se a densidade através de um densitómetro (DEN-18McFarland) não deixando exceder  $5 \times 10^8$  UFC/mL. Numa placa de 46 poços colocou-se em duplicado 200  $\mu$ L de concentração inicial (20 mg/mL) de cada extrato e efectuou-se sucessivas diluições até 0,015 mg/mL, como solvente foi usado os meios MH e TSB previamente preparados. De seguida adicionaram-se 10  $\mu$ L de bactéria contendo  $5 \times 10^8$  UFC/mL a cada um dos poços e no final, todas as placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. A visualização da MIC foi feita através da adição de 40  $\mu$ L de corante cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) (indicador de oxidação-redução utilizado para diferenciar os tecidos metabolicamente ativos dos não ativos) preparado no próprio dia. Após adição, colocaram-se as placas na estufa a 37 °C durante 30 min. A determinação da MIC foi definida como a concentração mais baixa do extrato, capaz de prevenir o crescimento microbiano, ou seja na presença de coloração rosa houve crescimento bacteriano e na ausência houve inibição do crescimento da bactéria por ação dos extratos. Assim, foi considerada a concentração mais baixa em mg/mL de extrato que pode proporcionar a inibição completa do crescimento.

### **3.1.5 Análise de Compostos Fenólicos e Antocianinas**

#### **3.1.5.1 Ácidos Fenólicos e Flavonóides**

Os extratos hidrometanólicos obtidos foram dissolvidos em metanol aquoso a 80% a 20 mg/mL e filtrados através de um disco de filtro LC descartável de 0.22  $\mu$ m. A análise cromatográfica foi realizada em sistema Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) equipado com um detetor de matriz de díodos acoplado a um detetor de massa de ionização por eletropulverização (LC-DAD-ESI/MSn), uma bomba quaternária Auto-sampler (mantida a 5 °C), um degaseificador e um compartimento de coluna termoestática automatizada. A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18 (3  $\mu$ m, 4.6 mm x 150 mm, Waters, Milford, MA, EUA) termostaticada a 35 °C.

Os solventes utilizados foram: (A) 0,1% de ácido fórmico em água, (B) acetonitrilo. O gradiente de eluição estabelecido foi isocrático a 15% B (5 min), 15% B a 20% B (5 min), 20-25% B (10 min), 25-35% B (10 min), 35-50% B (10 min) e re-equilíbrio da coluna, utilizando um caudal de 0.5 mL/min. A dupla deteção em linha foi realizada no

---

DAD utilizando 280 e 370 nm como comprimentos de onda preferidos e num espetómetro de massa (MS) ligado ao sistema HPLC através da saída da célula DAD.

A deteção MS foi realizada em modo negativo, usando um espetómetro de massa Linear Ion Trap LTQ XL (Thermo Finnigan, San Jose, CA, EUA) equipado com uma fonte ESI. O azoto serviu como gás de bainha (50 psi), o sistema foi operado com uma tensão de pulverização de 5 kV, uma temperatura da fonte de 325 °C e uma tensão capilar de -20 V. O deslocamento da lente do tubo foi mantido a uma tensão de -66 V. A varredura completa cobriu a faixa de massa de M/z 100 a 1500. A energia de colisão utilizada foi 35 (unidades arbitrárias). A aquisição dos dados foi realizada com o sistema de dados Xcalibur® (Thermo Finnigan, San Jose, CA, EUA).

Os compostos fenólicos foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção, UV-vis e espectros de massa com os obtidos a partir de compostos padrão, quando disponíveis. De outro modo, os compostos foram tentativamente identificados comparando as informações obtidas com os dados disponíveis relatados na literatura. Para análise quantitativa, foi construída uma curva de calibração para cada padrão fenólico disponível com base no sinal UV. Para os compostos fenólicos identificados para os quais não estava disponível um padrão comercial, a quantificação foi realizada através da curva de calibração do padrão mais semelhante disponível. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{extrato}}$ .

### **3.1.5.2 Antocianinas**

As amostras liofilizadas dos extratos (1 g) foram extraídas com 30 mL de metanol contendo TFA 0,5% e filtradas através de papel Whatman N° 4. O resíduo foi então re-extraído duas vezes com 30 mL de TFA 0,5% em metanol. Os extratos foram concentrados, liofilizados, re-dissolvidos em 1 mL de metanol aquoso 20% e depois filtrados através de filtros de papel Whatman N° 4.

Os extratos foram analisados através do sistema de HPLC descrito anteriormente e de acordo com o procedimento descrito por Gonçalves *et al.*, (2017).

A separação cromatográfica foi conseguida numa coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18, (3  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm x 150 mm) de fase reversa termostaticada a 35 °C. Os solventes usados foram: (A) 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) em água, (B) acetonitrilo. A eluição em gradiente seguiu os seguintes parâmetros: 10% de B durante 3 min, de 10 a 15% de B durante 12 min, 15% de B durante 5 min, de 15 a 18% de B durante 5 min, de

---

18 a 30% de B durante 20 min, de 30 a 35% de B durante 5 min e de 35 a 10% durante 10 min.

O tempo total de execução resultante foi de 60 minutos, seguido por acondicionamento de coluna de 10 minutos, utilizando um caudal de 0.5 mL/min. A dupla detecção em linha foi realizada no DAD utilizando 520 nm como o comprimento de onda preferido e num espetómetro de massa (MS) ligado ao sistema HPLC através da saída da célula DAD.

A detecção de MS foi realizada em modo positivo, utilizando um espetómetro de massa Linear Ion Trap LTQ XL (Thermo Finnigan, San Jose, CA, EUA) equipado com uma fonte ESI. O azoto serviu como gás de bainha (50 psi), o sistema foi operado com uma tensão de pulverização de 4.8 kV, uma temperatura de fonte de 320 °C e uma tensão capilar de 14 V.

O deslocamento da lente do tubo foi mantido a uma tensão de 75 V. A varredura completa cobriu a faixa de massa de M/z 100 a 1500. A energia de colisão utilizada foi de 20 (unidades arbitrárias). A aquisição dos dados foi realizada com o sistema de dados Xcalibur® (Thermo Finnigan, San Jose, CA, EUA).

As antocianinas presentes nas amostras foram caracterizadas de acordo com o seu espectro UV e de massa, e tempo de retenção por comparação com padrões, quando disponíveis. Para análise quantitativa, obtiveram-se as curvas de calibração por injeção de soluções-padrão com concentrações conhecidas (0,25-50 µg/mL). Os resultados foram expressos em µg/g<sub>extrato</sub>.

### **3.2. Otimização do Processo de Extração**

A otimização do processo de extração foi realizada no Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho.

Foram otimizados os seguintes parâmetros: solvente, temperatura e tempo de extração para todos os extratos em estudo.

Após a otimização dos parâmetros de extração, foram realizadas novas extracções usando como solvente o lactato de etilo, a fim de se verificar possíveis alterações no teor de fenóis totais, atividade antioxidante e tipo de compostos fenólicos presentes em cada extrato.

---

### 3.2.1. Solvente de Extração

Devido à pouca quantidade de extratos SU e PHU disponíveis, o processo de otimização do solvente foi realizado usando apenas o extrato MU (mistura do bagaço da uva). Inicialmente foram testados a água, etanol 96% e combinações diferentes de etanol:água (20:80 v/v; 50:50 v/v; 80:20 v/v). Os ensaios foram realizados a 30 °C e 50 °C em banho maria Julabo SW-22 230 V com agitação constante a 170 rpm. Os solventes foram avaliados de acordo os resultados obtidos referentes ao rendimento de extração, poder antioxidante pelo método DPPH e teor de fenóis totais pelo método do reagente Folin-Ciocalteu.

### 3.2.2. Processo de Extração

O processo de extração baseou-se numa maceração onde o rácio sólido-líquido foi um parâmetro fixo (1 g de extrato para 30 mL de solvente). Aos extratos pesados (1 g) foram adicionados 30 mL de solvente e colocados num banho Julabo SW-22 230 V, à temperatura desejada com agitação orbital constante a 170 rpm.

A mistura foi filtrada através de um sistema de filtração a vácuo, utilizando filtros de papel (7-10 µm) e o filtrado recolhido para tubos de falcon de 50 mL estéreis previamente identificados.

Aos extratos recolhidos após a filtração, foram retiradas alíquotas de 2 mL para eppendorfs estéreis para congelar, previamente identificados a fim de preservar os compostos. Os extratos mantidos em tubos de falcon foram colocados numa sala fria a 5 °C para posteriormente determinar a sua concentração, poder antioxidante e teor de fenóis totais.

Os ensaios para determinar a concentração dos extratos foram realizados em duplicado, pelo método do peso seco. Foram pesados cerca de 1 g de extrato líquido para formas de alumínio previamente pesadas e colocadas na estufa a secar a 105 °C durante 24 h.

A massa seca foi determinado pela seguinte equação:

$$m_{\text{extrato seco}} (\text{g}) = m_{\text{forma+extrato seco}} (\text{g}) - m_{\text{forma}} (\text{g}) \quad [5]$$

A capacidade antioxidante foi avaliada pelos métodos DPPH (descrito anteriormente), ABTS e FRAP. No método ABTS, inicialmente foi preparado o radical ABTS (mistura de 5 mL de stock ABTS com 88 µL de persulfato de potássio. Após 16 h no escuro, 1

---

mL desta solução foi diluído em 50 mL de etanol 96 %, ajustando-se a absorvância a 0.70 a 734 nm. Após o reagente ABTS apresentar absorvância de 0.70, foram colocados 10 µL de extrato numa placa de 96 poços e 200 µL de reagente ABTS. A placa guardou-se no escuro durante 6 min e a absorvância foi lida a 734 nm. Trolox foi usado como padrão ( $y = 0.1056x + 0.05$ ;  $r^2=0.9998$ ) e os resultados expressos em micromol de Trolox Equivalente por grama de extrato.

No método FRAP, foi preparado o reagente FRAP (mistura de 5 mL de TPTZ, 5 mL de  $\text{FeCl}_3$  e 50 mL de tampão acetato). Numa placa de 96 poços foram colocados 10 µL de extrato e 290 µL de reagente FRAP, colocou-se a placa no escuro a 37 °C durante 15 min e leu-se a absorvância a 593 nm. Sulfato de ferro foi usado como padrão ( $y= 0.0006x + 0.2828$ ;  $r^2= 0.9993$ ) e os resultados expressos em miligramas de  $\text{Fe}^{2+}$  por grama de extrato.

A determinação do teor de fenóis foi realizada através do método Folin-Ciocalteu: numa placa de 96 poços foram colocados 5 µL de extrato, 60 µL de carbonato de sódio, 15 µL de reagente Folin-Ciocalteu e 200 µL de água pura. A placa foi colocada na estufa a 60 °C durante 5 min e a absorvância foi lida a 700 nm. O ácido gálico foi usado como padrão, sendo o teor de fenóis totais calculado através da curva de calibração ( $y = 0.001x - 0.1298$ ;  $r^2 = 0.9935$ ). Os resultados são expressos em miligramas de ácido gálico por grama de extrato.

### **3.2.3 Otimização do Tempo e Temperatura de Extração**

O desenho experimental factorial  $2^2$  foi desenvolvido com objetivo de avaliar o efeito da temperatura e do tempo de extração. Através da elaboração de um desenho experimental (**Tabela 4**) foi possível realizar os ensaios das extracções em simultâneo, avaliando o tempo em intervalos de 30 min, 60 min e 90 min, bem como o parâmetro da temperatura, avaliado a 30 °C, 50 °C e 70 °C.

O procedimento de extração foi seguido de acordo com o descrito anteriormente na secção 3.2.2. A otimização de ambos os parâmetros foi avaliada tendo em conta o teor de fenóis obtidos em cada extrato.

**Tabela 4: Condições de extração do desenho experimental**

<b>Ensaio</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
1	30 (-1)	30 (-1)
2	30 (-1)	70 (+1)
3	90 (+1)	30 (-1)
4	90 (+1)	70 (+1)
5	18 (-1.41)	50 (0)
6	102 (+1.41)	50 (0)
7	60 (0)	22 (-1.41)
8	60 (0)	79 (+1.41)
9	60 (0)	50(0)
10	60 (0)	50 (0)
11	60 (0)	50 (0)
12	60 (0)	50 (0)

### **3.3 Extração com Lactato de Etilo**

As extrações usando o lactato de etilo foram realizadas num banho a óleo para ser possível o aumento da temperatura acima dos 100 °C. Assim, foi usado um banho a óleo Julabo pré-aquecido a 120 °C sendo o procedimento de extração usado, o descrito anteriormente em 3.2.2. O banho a óleo requer o uso de reatores próprios, onde se colocaram 1 g de extrato e 30 mL de solvente previamente aquecido em banho maria Julabo SW-22 230 V, a 80 °C com agitação constante a 170 rpm. Os reatores foram bem fechados e colocados dentro do banho a óleo durante 60 e 120 minutos.

De acordo com as regras de segurança do lactato de etilo, todas as extrações foram realizadas dentro da hotte não só pelo cheiro característico do lactato de etilo, mas também como precaução devido às temperaturas elevadas.

### **3.4 Análise Estatística**

Para cada preparação (extrato metanol/água) foram utilizadas três amostras e todos os ensaios foram realizados em triplicado. Os resultados foram expressos como valores médios  $\pm$  desvio padrão correspondentes (DP). Os resultados foram analisados por uma

---

análise de variância (ANOVA) seguida de teste HSD Tukey's com  $\alpha = 0,05$ . Este tratamento estatístico foi realizado pelo programa SPSS v. 20.0.

O tratamento de dados relativos à otimização do processo de extração foi realizado no programa STATISTICA versão 7.0. Os resultados foram analisados por uma análise de variância, gráficos de superfície e gráficos de Pareto.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Bioatividades

A eficácia da atividade antioxidante dos componentes bioativos depende da sua estrutura química e da concentração destes fitoquímicos no alimento. Por sua vez, o teor destes fitoquímicos é amplamente influenciado por fatores genéticos, condições ambientais, grau de maturação da planta, entre outros (Melo *et al.*, 2006). Trolox e ellipticina foram utilizados como controlos positivos nos ensaios de avaliação da atividade antioxidante e antitumoral, respetivamente.

Os resultados da média e desvio-padrão baseados na capacidade de captação de radicais livres, no poder redutor, na inibição do  $\beta$ -caroteno e na inibição da peroxidação lipídica dos extratos hidrometanólicos obtidos a partir dos extratos do bagaço da *Vitis vinifera* L. estão apresentados na **Tabela 5**.

**Tabela 5: Atividade antioxidante dos extratos hidrometanólicos presentes no bagaço da uva (média  $\pm$  DP).**

	MU	SU	PHU
<b>Atividade Antioxidante</b> valores EC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>A</sup>			
Atividade captadora de radicais DPPH	123 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	23 $\pm$ 1 <sup>c</sup>	563 $\pm$ 14 <sup>a</sup>
Poder Redutor	262 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	110 $\pm$ 4 <sup>c</sup>	488 $\pm$ 10 <sup>a</sup>
Inibição da descoloração do $\beta$ -caroteno	362 $\pm$ 19 <sup>b</sup>	208 $\pm$ 9 <sup>c</sup>	782 $\pm$ 23 <sup>a</sup>
Inibição da formação de TBARS	97 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	49,6 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>	629 $\pm$ 3 <sup>a</sup>

Valores de EC<sub>50</sub> correspondentes à concentração de amostra que promove 50% da atividade antioxidante. A - valores de EC<sub>50</sub> do Trolox: 42  $\mu\text{g/mL}$  (DDPH), 41  $\mu\text{g/mL}$  (poder redutor), 18  $\mu\text{g/mL}$  (inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno) e 23  $\mu\text{g/mL}$  (Inibição da formação de TBARS). Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) onde “a”, “b” e “c” correspondem aos valores mais altos e mais baixos, respetivamente.

Na atividade antioxidante, o melhor e mais significativo resultado de EC<sub>50</sub> foi verificado no extrato das sementes, com valores de EC<sub>50</sub> mais baixos (23 a 208  $\mu\text{g/mL}$ ), seguido do extrato MU (97 a 362  $\mu\text{g/mL}$ ) e por fim, o extrato PHU (488 a 782  $\mu\text{g/mL}$ ). Comparando os resultados obtidos aos valores do padrão de Trolox, verifica-se que apenas o extrato das sementes quando aplicado o método da captura de radicais DPPH apresentam valores mais baixos que o padrão, o que se traduz numa alta atividade antioxidante por

---

parte do extrato das sementes em estudo. Os resultados obtidos são positivos e comparáveis com diversos estudos realizados com a *Vitis vinifera* L.. Xia *et al.* (2010) citaram a atividade antioxidante de extratos do bagaço da uva através do método DPPH, referindo que as sementes apresentam maior atividade, seguidamente das peles e mosto. Os mesmos autores reportam ainda que o bagaço da uva quando avaliado pelo método DPPH, apresenta um valor de EC<sub>50</sub> de 0.20 g/L (200 µg/mL), o qual é próximo ao obtido experimentalmente no extrato da mistura do bagaço (MU = 123±5 µg/mL). Similarmente, Bartolomé *et al.* (2004) após um estudo sobre a atividade antioxidante da pele das uvas vermelhas da *Vitis vinifera* L. var. *Graciano*, *Cabernet Sauvignon* e *Tempranillo*, reportam que a atividade de eliminação de radicais livres contra o radical DPPH (valores de EC<sub>50</sub>) de extratos de pele da uva é relativamente alto cerca de 3,2 a 11,1 mg<sub>pele seca</sub>/mg<sub>DPPH</sub> comparado com algumas frutas e legumes, o que torna as peles de uva uma boa fonte de antioxidantes para ser utilizada como ingrediente em suplementos dietéticos ou como um aditivo natural para a preservação de alimentos. Nesta área de investigação, a controvérsia é também elemento a ter em consideração pois Alves *et al.* (2010) após a avaliação de vários métodos para determinar a atividade antioxidante reportam que devido aos diversos tipos de radicais e aos diferentes alvos de oxidação, dificilmente haverá um único método capaz de representar de forma segura e precisa a real atividade antioxidante de um composto. Em suma, vários autores relatam os efeitos positivos para a saúde dos extratos do bagaço da uva, nomeadamente a propriedade antioxidante, justificando assim a sua incorporação na indústria alimentar para evitar a oxidação lipídica, retardar o desenvolvimento de sabores não desejados bem como melhorar a estabilidade da cor dos alimentos. O interesse pela investigação de antioxidantes de origem natural tem aumentado consideravelmente na última década, originando assim, a substituição dos antioxidantes sintéticos que devido aos seus efeitos tóxicos e cancerígenos para a saúde humana já foram proibidos em alguns países. No entanto, é necessário a realização de mais estudos de investigação *in vitro* dos extratos antes de transpor os resultados para condições *in vivo* (Fontana *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2005; Bozan *et al.*, 2008; Yilmaz e Toledo 2004).

Os dados científicos sobre os efeitos dos polifenóis nas doenças promoveram a comercialização de suplementos dietéticos e produtos alimentares ricos em polifenóis. Contudo, o consumo de tais produtos leva a um aumento da ingestão de polifenóis específicos para além dos níveis comuns de ingestão associados à dieta. No ser humano,

nunca foi relatado casos de toxicidade após o consumo de polifenóis na dieta, no entanto, um elevado consumo de polifenóis pode aumentar o risco de algumas doenças. Os estudos relacionados com o risco de doenças são ainda muito limitados, sendo que são conhecidos apenas os efeitos pró-oxidantes (químicos que induzem o stress oxidativo danificando as células) dos polifenóis na dieta humana (Scalbert *et al.*, 2005). Os resultados referentes à atividade citotóxica dos extratos em estudo estão representados na **Tabela 6**.

**Tabela 6: Atividade citotóxica dos extratos hidrometanólicos presentes no bagaço da uva (média ± DP).**

	MU	SU	PHU
<b>Atividade Citotóxica</b> valores GI <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>B</sup>			
MCF-7	332 ± 20	352 ± 21	>400
NCI-H460	>400	>400	>400
HeLa	>400	253 ± 26	>400
HepG2	>400	>400	>400
PLP2	>400	>400	>400

Valores de GI<sub>50</sub> correspondentes à concentração de amostra que promove 50% de inibição em células tumorais humanas ou em culturas de células primárias PLP2. B- Valores de GI<sub>50</sub> Ellipticina: 1,21 µg/mL (MCF-7), 1,03 µg/mL (NCI-H460), 0,91 µg/mL (HeLa), 1,10 µg/mL (HepG2) e 2,29 µg/mL (PLP2).

De acordo com os resultados acima referidos, das quatro linhas tumorais testadas apenas duas apresentaram atividade citotóxica. A linha celular MCF-7 (carcinoma da mama) foi sensível a dois extratos, SU e MU apresentado valores de GI<sub>50</sub> de 352 µg/mL e 332 µg/mL, respetivamente. Enquanto que a linha celular HeLa (carcinoma cervical) foi sensível somente ao extrato SU com um valor de GI<sub>50</sub> igual a 253 µg/mL. Relativamente à citotoxicidade dos extratos, os resultados obtidos para a linha celular não tumoral (PLP2 – linha primária de fígado de porco) foram positivos, nenhum dos extratos apresentou toxicidade para as células. Em suma, o extrato das sementes é o extrato que maior atividade antitumoral apresenta, perante as linhas celulares tumorais estudadas. Uma possível justificação é o facto de ser o único extrato que contém catequina 149±2 µg/g<sub>extrato</sub> (segundo a avaliação em HPLC). É também relevante

---

comparar os valores obtidos com os valores do padrão, sendo estes bastante superior aos obtidos pelos extratos, evidenciando assim a baixa atividade antitumoral dos extratos em estudo. Vários autores relatam a atividade citotóxica deste tipo de extratos através de diversas linhas celulares tumorais. Um estudo realizado por Aghbali *et al.* (2013) sobre os efeitos citotóxicos induzidos por extrato das sementes do bagaço da uva *Vitis vinifera* L. (extraídos em metanol) no carcinoma de células escamosas orais (KB), relata que os extratos exibem efeito apoptótico sob as células (confirmado pela inibição do crescimento celular). A citotoxicidade mais significativa foi alcançada na maior concentração e maior tempo de contacto (24 h) do bagaço com as células KB ( $IC_{50}=245,95 \mu\text{g/mL}$ ). Um outro estudo, realizado por Hudson *et al.* (2007) sobre a inibição do crescimento do cancro da próstata através de extratos de pele de uva *muscadine* e resveratrol através de mecanismos distintos, revela que os extratos da pele de uva e o resveratrol direcionam caminhos diferentes para inibir o crescimento de células de cancro da próstata e as propriedades únicas dos extratos da pele de uva sugerem que estes podem ser uma fonte importante para o desenvolvimento de agentes quimiopreventivos ou terapêuticos contra o cancro da próstata. Semelhante a este, outro estudo sobre a inibição da proliferação de células cancerígenas *in vitro* por extratos de frutos (mirtilos, framboesas ameixa, maçã, cerejas, groselha preta) realizado por Olsson *et al.* (2004) conclui que os extratos diminuíram a proliferação de ambas as células de cancro do cólon HT-29 e da mama MCF-7 e o efeito foi dependente da concentração. O efeito de inibição para a maior concentração de extratos foi em média de 62% para as células HT29 e 52% para as células MCF-7. Damianaki *et al.* (2000) estudaram a ação inibidora dos polifenóis presentes no vinho tinto em células do cancro da mama humanas (MCF-7, T47D e MDA-MB-231). Os resultados mostraram que os polifenóis diminuem a proliferação celular dependendo da dose e do tempo, sugerindo assim que, baixas concentrações de polifenóis bem como o consumo consecutivo de vinho tinto ou outros alimentos/bebidas ricos em polifenóis, podem ter um efeito antiproliferativo benéfico no crescimento de células do cancro da mama. Um estudo similar foi desenvolvido por Wang e Stoner (2008) sobre a função das antocianinas na prevenção do cancro. Através do efeito das antocianinas sob as proteínas reguladoras do ciclo celular, as antocianinas têm a capacidade de bloquear vários estágios do ciclo inibindo assim a proliferação celular. Os autores relatam ainda que as antocianinas puras e os extratos de frutas e vegetais ricos em antocianinas exibem atividade antiproliferativa

para os mais variados tipos de células cancerígenas *in vitro*. Um estudo realizado por Corrêa *et al.* (2017) sobre a estabilidade e atividade biológica de fitoquímicos presentes no bagaço da uva da *Vitis vinifera* L. var. *Merlot*, no qual avaliaram também o efeito antiproliferativo do extrato do bagaço sobre o crescimento da inibição de quatro linhas tumorais humanas (MCF-7, HeLa, HepG2 e NCI-H460). Os resultados demonstraram que, em geral, os extratos não apresentaram atividade antiproliferativa contra as linhas celulares tumorais testadas, à exceção da linha HeLa, que apresentou um GI<sub>50</sub> de cerca de 15 µg/mL. Ainda que os resultados obtidos neste estudo indiquem baixa atividade antitumoral dos extratos, um consumo continuado de vinho pode contribuir a longo prazo para uma proteção do organismo humano. Contudo, os resultados obtidos confirmam o eventual carácter preventivo dos extratos do bagaço da uva. Evidenciando os resultados, os polifenóis presentes em determinados alimentos exibem efeitos anticancerígenos, contribuindo significativamente para a saúde humana. No entanto, serão necessários mais estudos humanos *in vivo* para fornecer provas definitivas sobre a ação protetora dos polifenóis (Scalbert *et al.*, 2005; Naczki e Shahidi, 2004; Yilmaz e Toledo, 2004; Wang e Stoner, 2008; Dashwood, 2007; Dai e Mumper, 2010).

Os polifenóis extraídos a partir do bagaço da uva têm capacidade antimicrobiana para serem utilizados na indústria alimentar como preservantes, bem como na medicina suprimindo o crescimento de bactérias patogênicas e prevenção da oxidação dos lípidos. Os resultados obtidos relativos à atividade antimicrobiana dos extratos em estudo estão representados na **Tabela 7**.

**Tabela 7: Atividade antimicrobiana dos extratos hidrometanólicos presentes no bagaço da uva (média ± DP).**

	MU	SU	PHU
<b>Atividade Antimicrobiana valores MIC (mg/mL)</b>			
<b>Bactérias Gram negativo</b>			
<i>Escherichia coli</i> ULSNE	20	20	>20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CHTMAD	>20	10	>20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ULSNE	>20	10	>20

<i>Morganella morganii</i>	10	20	>20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	20	>20
<b>Bactérias Gram positivo</b>			
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	2,5	>20
<i>Listeria monocytogenes</i>	20	10	>20
MRSA	10	5	20
MSSA	10	5	20

Valores de MIC correspondentes à concentração mínima de amostra que inibiu o crescimento bacteriano.

Tendo em conta os resultados obtidos, os extratos em estudo apresentaram maior atividade antimicrobiana perante as bactérias Gram positivo (*Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* MRSA e MSSA) em comparação com as Gram-negativo (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii* e *Pseudomonas aeruginosa*). Perante todas as bactérias em estudo o extrato SU foi o que apresentou mais atividade antimicrobiana apresentou com valores de MIC entre os 2,5 e 20 mg/mL. Uma explicação para o facto do extrato das sementes ser o que o mais apresenta atividade antimicrobiana é a presença da epicatequina (984  $\mu\text{g/g}_{\text{extrato}}$ ). Oliveira *et al.* (2013) ao estudar as bioatividades dos extratos do bagaço da uva *Merlot* por extração supercrítica de CO<sub>2</sub> classificou-os como inibidores fortes (valores de MIC abaixo de 0,5 mg/mL, inibidores moderados (valores de MIC entre 0,6-1.5 mg/mL e inibidores fracos (valores de MIC acima de 1,6 mg/mL). Tendo em conta que esta classificação requer sob estirpes ATCC (American Type Culture Collection), os extratos em estudo apresentam valores de MIC bastante mais elevados o que é justificado pelo tipo de bactérias testadas, pois, sendo isolados clínicos multirresistentes é mais difícil a inibição do seu crescimento. Os resultados são positivos e comparáveis aos obtidos por diversos autores, Jayaprakasha *et al.*, (2003) aplicaram extratos de sementes de uva para estudar a concentração mínima inibitória com capacidade antibacteriana. Os resultados mostraram que os extratos exibiram efeito antibacteriano contra todas as bactérias estudadas e os extratos de sementes foram mais eficazes contra bactérias Gram-positivo (340-390 mg<sub>GAE</sub>/L) em comparação com bactérias Gram-negativo (475-575 mg<sub>GAE</sub>/L). Um estudo realizado por Oliveira *et al.* (2013) sobre atividade antimicrobiana dos

---

extrato do bagaço da *Vitis vinifera* L. (var. *Syrah* e *Merlot*) através da extração por supercrítica com CO<sub>2</sub>, evidenciou que os extratos da var. *Syrah* foram menos eficientes contra os microrganismos testados (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*) e os extratos *Merlot* foram mais ativos contra as bactérias Gram-positivo. Os extratos *Merlot* obtidos a 300 bar/50 °C e 150 bar/50 °C mostraram valores de MIC mais baixos contra o *S. aureus*, 625±375 e 750±250 µg/mL, respetivamente. Deste modo, os autores classificam os extratos supercríticos do bagaço como inibidores moderados contra bactérias Gram-positivo (*S.aureus* e *B.cereus*). Vários autores evidenciam a aplicação de compostos fenólicos extraídos a partir do bagaço da uva não só na indústria alimentar como preservante e conservante mas também na medicina, suprimindo o crescimento de bactérias patogénicas. No entanto, é necessária uma maior concentração de polifenóis para atingir a atividade antimicrobiana desejada em comparação com antibióticos/antimicrobianos convencionais (Yu e Ahmedna, 2013; Xia *et al.*, 2010; Fontana *et al.*, 2013; Lambert e Pearson, 2000; Rathi e Rajput, 2014).

#### 4.2 Identificação e Quantificação dos Compostos Fenólicos

O perfil fenólico dos extratos foi determinado em sistema HPLC sistema HPLC acoplado a um detetor de díodos de ionização por eletropulverização, acoplado a um detetor de massa (LC-DAD-ESI/MSn). Foram usados dois comprimentos de onda para deteção de compostos não-antocianínicos, 280 nm para identificação de ácidos fenólicos e 370 nm para identificação de flavonóides. Enquanto a deteção de compostos antocianínicos nomeadamente as antocianinas, foi realizada a um comprimento de onda de 520 nm, pois são o único grupo de fenólicos que absorvem luz visível a este comprimento de onda, ao contrário de outros compostos que são incolores nesta gama de comprimentos de onda. Os resultados obtidos relativos à tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos não-antocianínicos e antocianínicos estão representados na **Tabela 8**.

Os cromatogramas referentes à identificação de compostos não-antocianínicos de cada extrato encontram-se no **Axeno A**. A identificação tem como base a comparação dos espectros de massa com os padrões comerciais.

A tentativa de identificação dos compostos foi baseada no trabalho reportado por Cádiz-Gurrea *et al.* (2017) e Corrêa *et al.* (2017). De acordo com os resultados obtidos, foram

---

identificados no total 28 compostos, cerca de 21 compostos não-antocianínicos e 7 antocianínicos.

Relativamente à quantificação dos compostos, esta é realizada tendo em conta a área dos picos dos cromatogramas. No total, foram quantificados mais compostos não-antocianínicos 5380, 3903 e 10568  $\mu\text{g/g}_{\text{extrato}}$  nos extratos MU, PHU e SU respetivamente, do que compostos antocianínicos 2,25, 7,9 e 0,034  $\mu\text{g/g}_{\text{extrato}}$  nos extratos MU, PHU e SU respetivamente.

Entre os compostos não-antocianínicos, o tetrâmero de epicatequina do tipo  $\beta$  é o composto presente em maior quantidade no extrato MU com 1035  $\mu\text{g/g}_{\text{extrato}}$ , seguido do hexóxido do ácido *p*-cumárico no extrato PHU com 1092  $\mu\text{g/g}_{\text{extrato}}$ , e por último no extrato SU, o dímero de epicatequina do tipo  $\beta$  com 1466,9  $\mu\text{g/g}_{\text{extrato}}$ . Relativamente aos compostos antocianínicos, a petunidina-rutinósido é o composto presente em maior quantidade nos extratos MU e PHU cerca de 0,72 e 2,65  $\mu\text{g/g}_{\text{extrato}}$  respetivamente, ao contrário da malvidina-rutinósido que se encontra em maior quantidade no extrato SU, cerca de 0,024  $\mu\text{g/g}_{\text{extrato}}$ .

Como referido anteriormente, são vários os fatores que estão associados à identificação e quantificação dos compostos presentes nos extratos, nomeadamente o clima da região. A quantidade de radiação solar que as uvas captam durante o ano é fundamental não só para uma boa qualidade do vinho, mas também para o desenvolvimento da composição fenólica. Segundo Simon *et al.* (2017) a radiação solar é o fator ambiental mais importante para a fotossíntese, pois níveis elevados de radiação global tendem a resultar em altas concentrações de açúcares, compostos fenólicos e pH.

A análise cromatográfica identificou vários compostos fenólicos entre eles, derivados de ácidos hidroxibenzóicos (ácido gálico) e hidroxicinâmicos (ácido *p*-cumárico), flavonóis, flavanóis e antocianinas.

As procianidinas são polímeros de catequina e epicatequina, derivados das cianidinas (libertadas a partir das proantocianidinas através da ruptura das ligações entre monómeros provocados pelo aquecimento em meios ácidos e alcoólicos). As proantocianidinas do tipo- $\beta$  são classificadas como dimétricas (procianidinas B1, B2, B3, B4, B5, B6 e B8) e triméricas (C1 e C2). Deste modo, os monómeros da catequina e epicatequina foram identificados apenas no extrato das sementes, ao contrário das procianidinas diméricas e triméricas (trímeros e dímeros da epicatequina do tipo- $\beta$ ) que se encontram também nos restantes extratos (Cabrita *et al.*, 1999; Dallas *et al.*, 1995).

---

Segundo Cabrita *et al.* (1999) o teor de procianidinas presentes nas uvas é bastante diferente, variando de casta para casta. Assim, a procianidina B1 é normalmente mais abundante nas peles, enquanto a B2 é mais abundante nas sementes. Sendo as triméricas, nomeadamente a C2 mais abundante nas peles.

**Tabela 8: Tempo de retenção (*Rt*), comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{max}$ ), dados espectrais de massa, tentativa de identificação e quantificação de compostos fenólicos (não-antocianínicos e antocianínicos) em extratos hidrometanólicos de sementes, peles e mistura do bagaço da uva.**

Pico	<i>Rt</i> (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	[ <i>M-H</i> ] ( <i>m/z</i> )	<i>MS</i> <sup>2</sup> ( <i>m/z</i> )	Tentativa de identificação	MU	PHU	SU
<b>Compostos Fenólicos Não Antocianínicos (<math>\mu\text{g}/\text{g}_{\text{extrato}}</math>)</b>								
1	4.74	272	169	125(100)	Ácido gálico <sup>1</sup>	146 ± 1 <sup>b</sup>	104 ± 3 <sup>c</sup>	313 ± 1 <sup>a</sup>
2	5.24	276	331	169(100),125(3)	Glucósido de galoiol <sup>1</sup>	nd	nd	293 ± 4
3	8.52	277	289	245(42),203(36),187(27),161(13),137(28)	Catequina <sup>2</sup>	nd	nd	149 ± 2
4	10.26	280	577	451(18),425(82),407(91),289(100),287(18)	Dímero de (epi)catequina do tipo- $\beta^3$	nd	nd	803 ± 24
5	11.70	280	289	245(39),203(30),187(17),161(13),137(17)	Epicatequina <sup>3</sup>	ve	nd	984 ± 5
6	13.14	279	865	739(8),713(7),695(20),577(45),575(8),425(20),407(30),289(11),287(25)	Trímero de (epi)catequina do tipo- $\beta^3$	nd	nd	718,3 ± 18,1
7	13.97	311	325	163(100)	Hexósido do ácido <i>p</i> -cumárico <sup>4</sup>	434,02 ± 0,01*	729 ± 2*	nd
8	14.19	280	1153	865(3),863(14),577(7),575(5),289(14),287(5)	Tetrámero de (epi)catequina do tipo- $\beta^3$	nd	nd	840,9 ± 0,3
9	15.44	308	325	163(100)	Hexósido do ácido <i>p</i> -cumárico <sup>4</sup>	563 ± 3*	1092 ± 8*	nd
10	15.59	279	579	289(50),245(100),204(36)	Derivado da catequina <sup>3</sup>	nd	nd	690 ± 26
11	16.45	280	865	739(8),713(7),695(20),577(45),575(8),425(20),407(30),289(11),287(25)	Trímero de (epi)catequina do tipo- $\beta^3$	nd	nd	1031,1 ± 3,5
12	17.13	280	865	739(8),713(7),695(20),577(45),575(8),425(20),407(30),289(11),287(25)	Trímero de (epi)catequina do tipo- $\beta^3$	631 ± 6	nd	575 ± 10
13	17.56	278	577	451(18),425(82),407(91),289(100),287(18)	Dímero de (epi)catequina do tipo- $\beta^3$	nd	nd	1466,9 ± 14,2
14	17.84	280	1153	865(3),863(14),577(7),575(5),289(14),287(5)	Tetrámero de (epi)catequina do tipo- $\beta^3$	1035 ± 4	nd	803 ± 41
15	19.91	280	1153	865(3),863(14),577(7),575(5),289(14),287(5)	Tetrámero de (epi)catequina do tipo- $\beta^3$	nd	nd	580 ± 35
16	21.17	353	477	301(100)	Quercetina-glucoronídeo <sup>5</sup>	889 ± 1 <sup>a</sup>	343,5 ± 0,1 <sup>c</sup>	253 ± 2 <sup>b</sup>
17	21.61	354	493	331(100)	Laricitrina-3- <i>O</i> -galactósido <sup>5</sup>	292 ± 3 <sup>b</sup>	280 ± 4 <sup>c</sup>	308 ± 2 <sup>a</sup>
18	21.77	353	463	301(100)	Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido <sup>5</sup>	257,1 ± 0,5*	298 ± 0,1*	nd
19	23.64	353	507	345(100)	Siringetina-3- <i>O</i> -galactósido <sup>5</sup>	284 ± 2 <sup>a</sup>	444 ± 5 <sup>c</sup>	259 ± 2 <sup>b</sup>
20	24.02	313	655	509(15),501(52),475(68),347(13),329(100),314(12),303(5)	Laricitrina-3- <i>O</i> -ramnósido-7- <i>O</i> -ácido trihidroxicinâmico <sup>5</sup>	282 ± 3 <sup>a</sup>	344 ± 0,6 <sup>c</sup>	256 ± 1 <sup>a</sup>

21	24.52	312	745	653(22),419(38),345(100)	Derivado da siringetina rutinosido <sup>5</sup>	249 ± 3 <sup>a</sup>	269,4± 0,6 <sup>b</sup>	247 ± 1 <sup>b</sup>
<b>Total</b>						<b>5380 ± 21<sup>a</sup></b>	<b>3903 ± 15<sup>c</sup></b>	<b>10568 ± 35<sup>b</sup></b>

<b>Compostos Fenólicos Antocianínicos (µg/g<sub>extrato</sub>)</b>								
21	22.8	534	493	331(100)	Malvidina-hexósido <sup>6</sup>	0,30±0,01 <sup>b</sup>	0,783±0,001 <sup>a</sup>	0,010±0,001 <sup>c</sup>
22	37.4	532	535	331(100)	Malvidina-acetilhexósido <sup>6</sup>	0,057±0,001*	0,192±0,002*	nd
23	38.1	536	611	303(100)	Delfinidina-rutinosido <sup>7</sup>	0,366±0,002*	1,60±0,08*	nd
24	40.4	536	655	331(100)	Malvidina-dihexósido <sup>6</sup>	0,067±0,001*	0,267±0,003*	nd
25	41.3	532	625	317(100)	Petunidina-rutinosido <sup>7</sup>	0,72±0,04*	2,65±0,03*	nd
26	43	524	609	301(100)	Peonodina-rutinosido <sup>8</sup>	0,048±0,001*	0,115±0,005*	nd
27	44.2	532	639	331(100)	Malvidina-rutinosido <sup>6</sup>	0,70±0,01 <sup>b</sup>	2,335±0,0001 <sup>a</sup>	0,024±0,001 <sup>c</sup>
<b>Total</b>						<b>2,25±0,06<sup>b</sup></b>	<b>7,9±0,1<sup>a</sup></b>	<b>0,034±0,001<sup>c</sup></b>

ve- vestígios; nd- não detetado.

Curvas de calibração padrão: (1) Ácido gálico ( $y = 280379x + 119556$ ,  $R^2 = 0,9984$ ); (2) catequina ( $y = 84539x + 269612$ ,  $R^2 = 0,991$ ); (3) (-)-epicatequina ( $y = 28512x + 2E+06$ ,  $R^2 = 0,9998$ ); (4) ácido *p*-cumárico ( $y = 301950x + 6966,7$ ,  $R^2 = 0,9999$ ); (5) Quercetina-3-*O*-glucósido ( $y = 23853x + 343376$ ,  $R^2 = 0,9987$ ); (6) Malvidina ( $y = 477014,9x + 38,376$ ,  $R^2 = 0,999$ ); (7) Delfinidina ( $y = 557274x + 126,24$ ,  $R^2 = 0,999$ ); (9) Peonidina-3-*O*-glucósido ( $y = 537017x - 71,469$ ,  $R^2 = 0,9997$ ). Letras diferentes significam diferenças estatísticas significativas entre amostras ( $p < 0,05$ ), onde “a”, “b” e “c” correspondem aos valores mais altos e mais baixos, respetivamente. \*Valores estatisticamente diferentes *Student's t-test*  $p < 0,001$ .

---

Relativamente às antocianinas, Vermerris e Nicholson (2009) referem que estes compostos não são encontrados como agliconas livres, à exceção dos seguintes compostos coloridos: cianidina (laranja-avermelhado), peonidina (rosa-avermelhado), delphinidina (azul-violeta), petunidina (azul-arroxeadado) e malvidina (roxo). Segundo Cabrita *et al.* (1999), os compostos anteriores são do género *Vitis* e a sua quantidade é variável entre castas, sendo a malvidina o composto presente maioritariamente nas uvas. Os mesmos autores referem que é característico da *Vitis vinifera* encontrar-se uma molécula de glucose ligada na posição 3, o que pode explicar a presença da malvidina-rutinosido e malvidina-hexósido nos extratos em estudo e os principais ácidos que podem esterificar a glucose na posição 6 são o cafeico, acético e *p*-cumárico, o que justifica a presença do composto malvidina-acetilhexósido.

Os autores Downey e Rochfort (2008) mencionam que tal como as antocianinas, os flavonóis presentes em extratos de uva (quercetina, canferol, miricetina, laricitrina e siringitina) ocorrem naturalmente como glicósidos, o que é confirmado pela presença da molécula de glucose dos picos 17, 18 e 19 na **Tabela 8**.

Equiparando os resultados obtidos da análise em HPLC com outros estudos da literatura usando a mesma matriz, os resultados a nível da identificação dos compostos são positivos e semelhantes aos referidos por vários autores como Corrêa *et al.* (2017), Downey e Rochfort (2008) e Ribeiro *et al.* (2015).

Em comparação com outras matrizes já estudadas pela literatura, um estudo desenvolvido por Spínola *et al.* (2015) sobre identificação e quantificação de compostos fenólicos em morangos derivados na ilha da Madeira (Portugal), revelou que a composição fenólica deste fruto compreende exclusivamente a compostos derivados das antocianinas (antocianinas glicosiladas) cerca de 354,17 mg/100mL<sub>sumo</sub>, seguido dos ácidos hidroxibenzóicos 145,31 mg/100 mL<sub>sumo</sub>, flavonóis 43,92 mg/100 mL<sub>sumo</sub> e por último os ácidos hidroxicinâmicos 29,81 mg/100 mL<sub>sumo</sub>. Referenciando ainda uma outra matriz, um estudo sobre mirtilos realizado por Brambilla *et al.* (2008) refere que a composição de antocianinas glicosiladas presentes em cinco cultivos de mirtilos (*Vaccinium corymbosum L.*) provenientes de Boves, Itália, compreende entre os 30,3 e 61,2 mg/100 mL<sub>sumo</sub>.

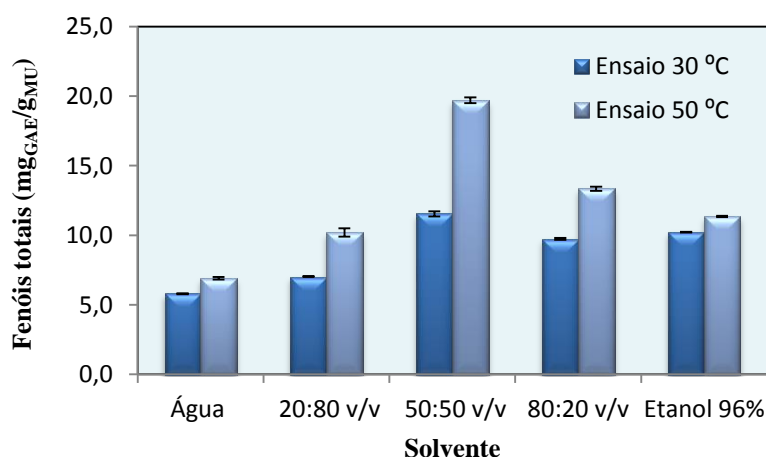
### 4.3 Otimização do Processo de Extração

#### 4.3.1 Solvente de Extração

Como referido anteriormente, as extrações para a escolha do melhor solvente foram realizadas apenas usando o extrato MU (mistura do bagaço da uva).

Os solventes em estudo foram a água, combinações água:etanol (20:80 v/v; 50:50 v/v; 80:20 v/v) e etanol a 96%. Os ensaios foram realizados em duplicado, todos os solventes foram avaliados a temperaturas de 30 °C e 50 °C durante 1 h com agitação constante de 170 rpm. A análise dos resultados teve em conta a percentagem de rendimento de extração obtido, a atividade antioxidante (valores de  $EC_{50}$ ) e o teor de fenóis totais

Os resultados obtidos (média  $\pm$  DP) são apresentados nas **Tabelas B.1 e B.2**. É evidente que tanto a 30 °C como a 50 °C a combinação água:etanol 50:50 v/v é o solvente que melhor se adequa à extração deste tipo de compostos. Ainda que a percentagem de rendimento de extração a 30 °C e 50 °C seja inferior (6,95% e 9,45%, respetivamente) quando comparado com o rendimento de extração com etanol (15,10% e 17,20% a 30 °C e 50 °C respetivamente), a sua escolha é justificada pela comparação com os restantes solventes relativamente ao teor de fenóis totais (11,54  $mg_{GAE}/g_{MU}$  e 19,70  $mg_{GAE}/g_{MU}$  a 30 °C e 50 °C respetivamente) representado na **Figura 9** e dos baixos valores de  $EC_{50}$  (0,24 g/L e 0,15 g/L).



**Figura 9:** Teor de fenóis totais presentes no extrato MU na presença de vários solventes.

### 4.3.2 Tempo e Temperatura de Extração

Sendo a combinação etanol:água 50:50 v/v o melhor solvente em estudo, procedeu-se então à otimização do processo de extração. A otimização teve como variáveis de estudo o tempo e a temperatura e a variável de resposta o teor de fenóis totais presentes em cada extrato. O teor de fenóis totais foi determinado através do método Folin-Ciocalteu descrito anteriormente. As extrações foram realizadas para todos os extratos em estudo em duplicado e de acordo com o desenho experimental anteriormente descrito, os resultados obtidos (média±DP) estão representados na **Tabela 9**.

A primeira diferença a olho nu entre os ensaios realizados é a coloração. Os ensaios realizados a 50 °C e acima deste valor apresentaram uma coloração mais forte do que os realizados a 22 °C e 30 °C, sendo os tons de cor sempre os mesmos, as sementes apresentam coloração amarelo-pálido e um tom alaranjado a temperaturas acima dos 70 °C, enquanto as misturas MU e PHU apresentaram coloração vermelho-violeta e um tom mais forte a temperaturas acima dos 70 °C.

**Tabela 9: Teor de fenóis totais (média±DP) presentes nos extratos em estudo.**

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	MU	SU	PHU
			(mg <sub>GAE</sub> /g <sub>MU</sub> )	(mg <sub>GAE</sub> /g <sub>SU</sub> )	(mg <sub>GAE</sub> /g <sub>PHU</sub> )
1	30	30	18,70 ± 0,06	22,98 ± 0,38	15,50 ± 0,05
2	30	70	31,19 ± 0,48	35,58 ± 4,28	25,49 ± 0,05
3	90	30	22,09 ± 0,17	25,28 ± 0,16	17,91 ± 0,18
4	90	70	48,33 ± 0,06	57,74 ± 0,77	31,86 ± 0,41
5	18	50	23,07 ± 0,08	26,19 ± 0,20	19,59 ± 0,54
6	102	50	27,11 ± 0,27	31,07 ± 0,09	23,01 ± 1,68
7	60	22	18,29 ± 0,04	20,33 ± 0,01	15,20 ± 0,06
8	60	79	41,95 ± 0,52	41,27 ± 0,69	29,81 ± 0,06
9	60	50	24,18 ± 0,23	30,03 ± 0,19	21,19 ± 0,66
10	60	50	24,14 ± 0,09	30,78 ± 0,01	21,30 ± 0,35
11	60	50	24,14 ± 0,11	30,39 ± 0,02	20,85 ± 0,58
12	60	50	24,10 ± 0,19	30,25 ± 0,05	21,30 ± 0,46

Em conformidade com os resultados apresentados na tabela anterior, o teor mais alto de fenóis presente em cada extrato foi obtido a 70 °C durante 90 min (ensaio 4), enquanto o teor mínimo de fenóis em cada extrato é obtido a 22 °C durante 60 min (ensaio 7). A análise estatística do teor de fenóis totais presente nos três extratos em estudo foi

realizada individualmente para cada extrato. De seguida, apresentam-se os gráficos de superfície e de pareto (**Figura 10**), relativos ao teor de fenóis totais presente nos extratos em estudo.

Para todos os extratos em estudo, não só os termos lineares (L) mas também os termos quadráticos (Q) e as interações tiveram significado estatístico ( $p < 0.05$ ) como é visível nos gráficos de pareto da **Figura 10**.

Os resultados apresentados nos gráficos de superfície (**Figura 10**) revelam que o valor da resposta, ou seja, o teor de fenóis totais foi linearmente aumentando com o valor das variáveis do processo (tempo e temperatura). Seria expectável obter um ponto máximo nas respostas, após o qual o valor da resposta diminuiria. Para todos os extratos obtidos, atendendo aos gráficos obtidos seria necessário aumentar ainda mais a temperatura e o tempo, a fim de se visualizar eventual diminuição.

Todas as respostas foram adaptadas a equações polinomiais de segunda ordem, a fim de descrever as variações da resposta (teor de fenóis totais) em função das variáveis no intervalo dos valores estudados. As equações obtidas para cada resposta em função das variáveis do processo estão apresentadas na próxima **Tabela 10**.

**Tabela 10: Equações do modelo quadrático tendo como variável de resposta o teor de fenóis em função das variáveis do processo, Temperatura (°C) e Tempo (min) e respetivos coeficientes de determinação.**

Resposta	Equações	R <sup>2</sup>
Teor de Fenóis (MU)	$18,0T + 6,56t + 7,21T^2 + 2,18t^2 + 24,1T.t + 6,87$	0,953
Teor de Fenóis (SU)	$18,7T + 7,84t + 3,28T^2 + 1,11t^2 + 30,4T.t + 9,93$	0,876
Teor de Fenóis (PHU)	$11,2T + 3,40t + 1,74T^2 + 0,53t^2 + 21,2T.t + 1,98$	0,984

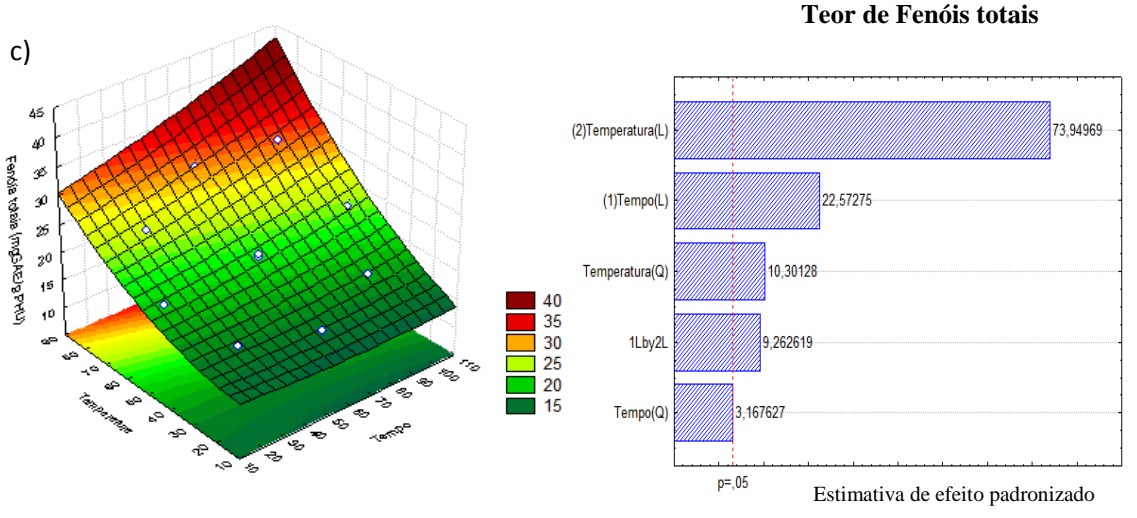
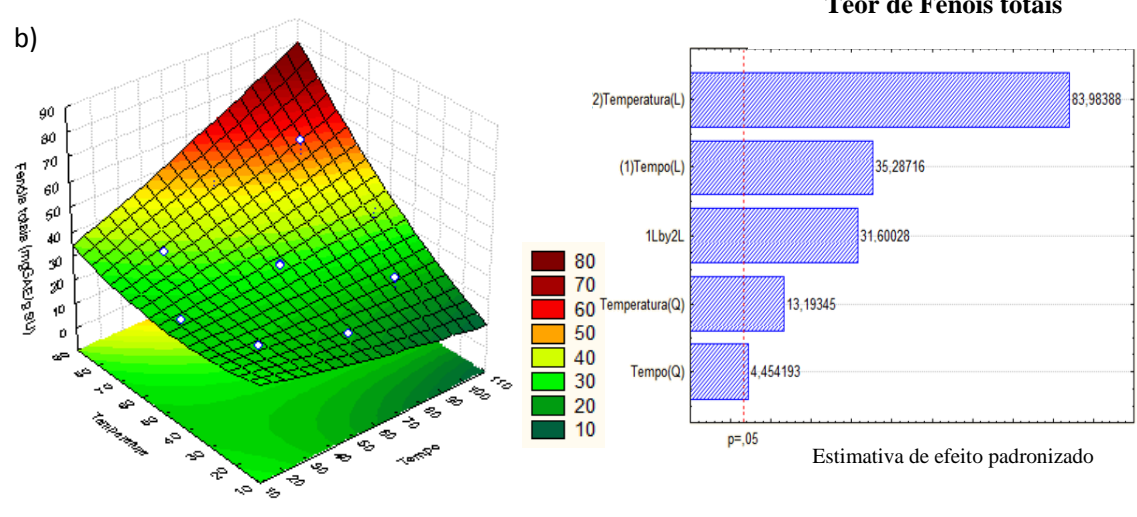
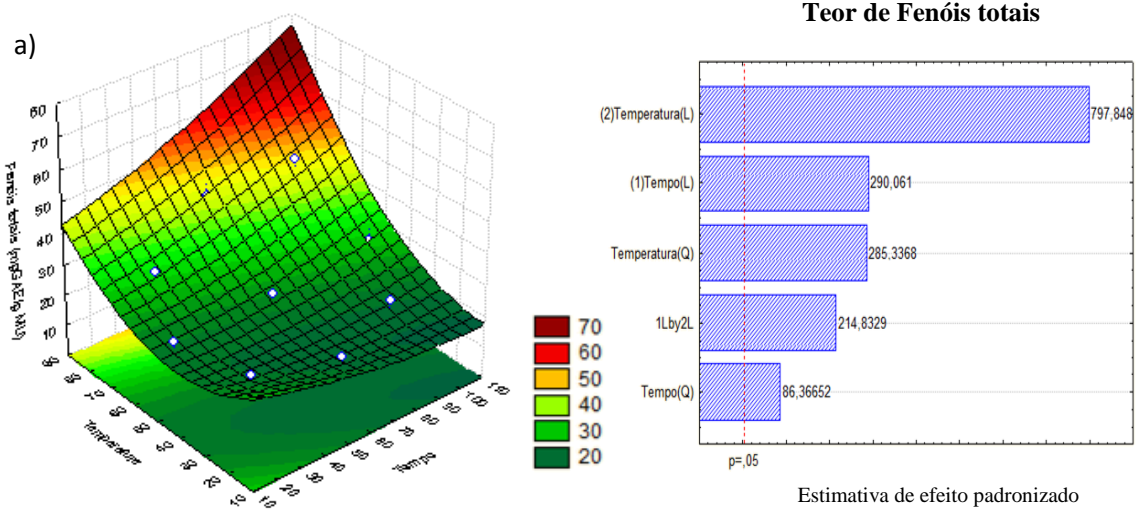
T-temperatura; t- tempo; r<sup>2</sup>-coeficiente de correlação. As equações estão expressas em termos de valores codificados (-1,0,+1).

As equações acima referidas, apresentaram bons coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) variando desde 0,876 a 0,984, o que significa uma elevada semelhança entre os resultados experimentais e os calculados pelas equações.

Os resultados obtidos relativamente ao teor de fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu são comparáveis a alguns estudos da literatura, nomeadamente um estudo realizado por Bartolomé *et al.* (2004) que revela o teor de fenóis totais obtidos a partir de extratos de

---

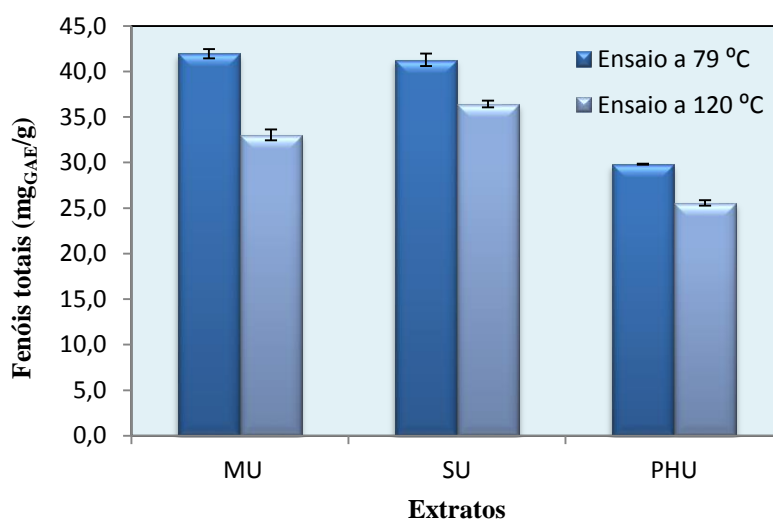
peles da uva *Vitis vinifera* L. (extraídos em metanol:ácido fórmico 95:5 v/v, durante 12 h) sendo cerca de 21,3 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>extrato</sub>, o qual é comparável aos obtidos (**Tabela 9**) no extrato das peles (entre 15,20 e 31,86 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>extrato</sub>). Ainda, um outro estudo semelhante foi realizado por Nechita *et al.* (2012), onde determinaram também o teor de fenóis totais presentes no bagaço, sementes e peles da *Vitis vinifera* L. extraídos em etanol. O teor de fenóis totais presentes no bagaço, sementes e peles foi cerca de 4,4, 25,3 e 11,6 g<sub>GAE</sub>/L, respectivamente. Apenas o extrato das sementes é semelhante ao obtido neste estudo, onde o teor de fenóis nas sementes está entre os 20,33 a 57,74 mg<sub>GAE</sub>/g (**Tabela 9**).



**Figura 10: Gráficos de superfície e pareto, para a variável fenóis totais obtidos a partir dos extratos a) MU, b) SU e c) PHU sob diferentes condições de tempo e temperatura. L e Q correspondem aos efeitos linear e quadrático, respectivamente.**

Em suma, de acordo com os resultados obtidos na otimização verifica-se que o intervalo de tempo inicialmente proposto (30, 60 e 90 min) para o desenho experimental poderia ser alargado, o que provavelmente resultaria numa melhor otimização. Um ligeiro aumento da temperatura tendo em conta o ponto de ebulição da mistura etanol:água 50:50 v/v (cerca de 81 °C) poderia também melhorar os resultados obtidos tendo em atenção que, temperaturas demasiado elevadas também provocariam a degradação dos compostos.

Contudo, de forma a verificar se altas temperaturas favorecem a extração, foram realizados ensaios em duplicado para cada extrato usando o mesmo solvente a 120 °C durante 30 minutos. Os ensaios realizados no banho a óleo requerem o uso de reatores metálicos, uma vez que os frascos de vidro onde foram realizadas as extrações anteriores não aguentariam elevadas temperaturas. Na **Figura 11** estão representados os valores obtidos para este ensaio (média±DP) em comparação com os obtidos a 79 °C (ensaio 8 do desenho experimental).



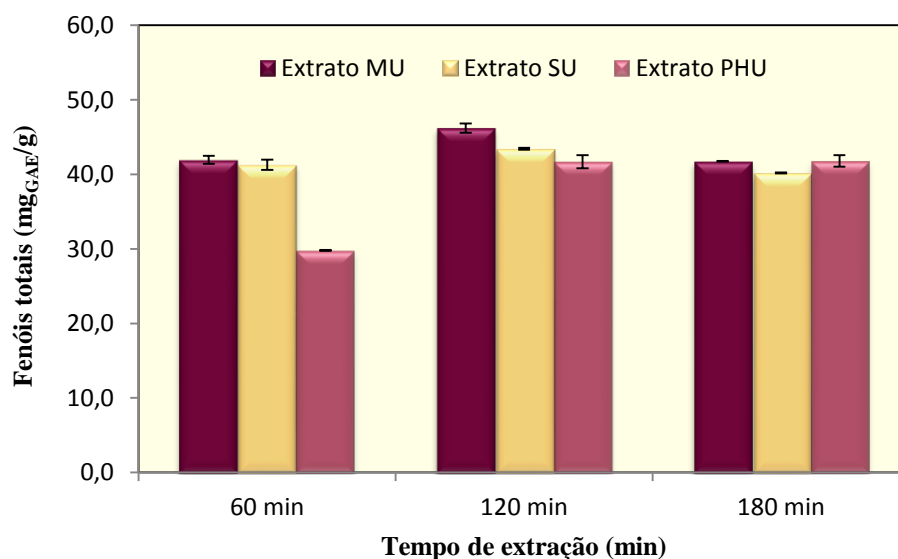
**Figura 11: Teor de Fenóis totais obtidos para cada extrato a 79 e 120 °C.**

Os resultados evidenciaram uma diminuição no teor de fenóis a 120 °C para 33,03 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>MU</sub>, 36,43 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>SU</sub> e 25,56 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>PHU</sub> presentes nos extratos MU, SU e PHU, respetivamente. Comparando os resultados obtidos a diferentes temperaturas, os valores obtidos a 120 °C são mais baixos do que os obtidos a 79 °C (41,95 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>MU</sub>, 41,27 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>SU</sub> e 29,81 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>PHU</sub>), evidenciando assim que, um aumento a 120 °C

resultou numa possível degradação de compostos fenólicos presentes nos diferentes extratos. Os tempos de extração são também diferentes, o ensaio a 79 °C durou cerca de 60 min, enquanto o ensaio a 120 °C durou apenas 30 min, contudo esta diferença de 30 min poderá não ser tão relevante comparado com a diferença de temperatura entre os ensaios (cerca de 40 °C). Perante tais resultados, e tendo em conta os obtidos na otimização é conclusivo que um aumento tão elevado da temperatura não é viável.

De modo a verificar a influência do tempo nas extrações tendo em conta que, tempos mais longos podem também causar a degradação dos compostos fenólicos, foram também realizados ensaios em duplicado a 79 °C durante 120 min e 180 min. Foi escolhido o ensaio 8 do desenho experimental como ponto de comparação entre os resultados obtidos.

A verificação de possíveis alterações no teor de fenóis totais é visível na **Figura 12**, onde estão representados os valores obtidos (média±DP) para a mesma temperatura mas a diferentes tempos de extração (60, 120 e 180 min).



**Figura 12:** Teor de Fenóis totais obtidos a 79 °C durante 60, 120 e 180 minutos para os extratos em estudo.

Atendendo aos resultados apresentados na figura acima, um aumento de mais 60 min (ponto 120 min) nas extrações é significativo apenas para o extrato PHU (aumento de 49,9%), nos restantes extratos não se verificam diferenças acentuadas (aumentos de 10,2% e 5,3%, extratos MU e SU, respetivamente). O teor de fenóis aos 60 min, cerca

---

de 41,95 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>MU</sub>, 41,27 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>SU</sub> e 29,81 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>PHU</sub> aumentou para 46,21 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>MU</sub>, 43,44 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>SU</sub> e 41,71 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>PHU</sub>, ao fim de 120 min, seguido de uma diminuição ao fim de 180 minutos (41,76 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>MU</sub>, 40,20 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>SU</sub> e 41,82 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>PHU</sub>). A diferença de tempo entre os 120 e 180 min é visível e sugere uma possível degradação dos compostos fenólicos além dos 120 min. Os resultados mostram que tempos de extração mais longos (acima dos 120 min) não se justificam, tendo em conta uma possível degradação, sendo também do ponto de vista industrial não viável pois resultaria num aumento dos gastos energéticos. Dai e Mumper (2010) relatam que uma das contradições neste tipo de extrações (maceração) é o seu potencial de poluição para o meio ambiente devido à elevada quantidade de solvente orgânico utilizado e ao longo tempo de extração requerido por estes métodos.

A fim de verificar a atividade antioxidante como critério de otimização de extração, foram também avaliados o poder antioxidante pelo método ABTS e FRAP. Os resultados obtidos pelo método ABTS estão expressos em  $\mu\text{mol}_{\text{TE}}/\text{g}$ , enquanto os obtidos pelo método FRAP estão expressos em  $\text{mg}_{\text{Fe}^{2+}}/\text{g}$ . Na **Figura 13** estão representados os gráficos de superfície obtidos nos três extratos para ambos os métodos. Os resultados obtidos referentes aos métodos ABTS e FRAP, evidenciam que a atividade antioxidante foi linearmente aumentando com o aumento do tempo e da temperatura. Similarmente aos resultados obtidos para os fenóis totais, seria também expectável obter um ponto máximo nas respostas, após o qual o valor da resposta diminuiria. Contudo, e de acordo com os gráficos de superfície os pontos ótimos não são bem definidos, mas estima-se que estes se localizem entre os 75 °C – 85 °C e 60 - 90 minutos, para a temperatura e tempo, respetivamente.

### Método ABTS

### Método FRAP

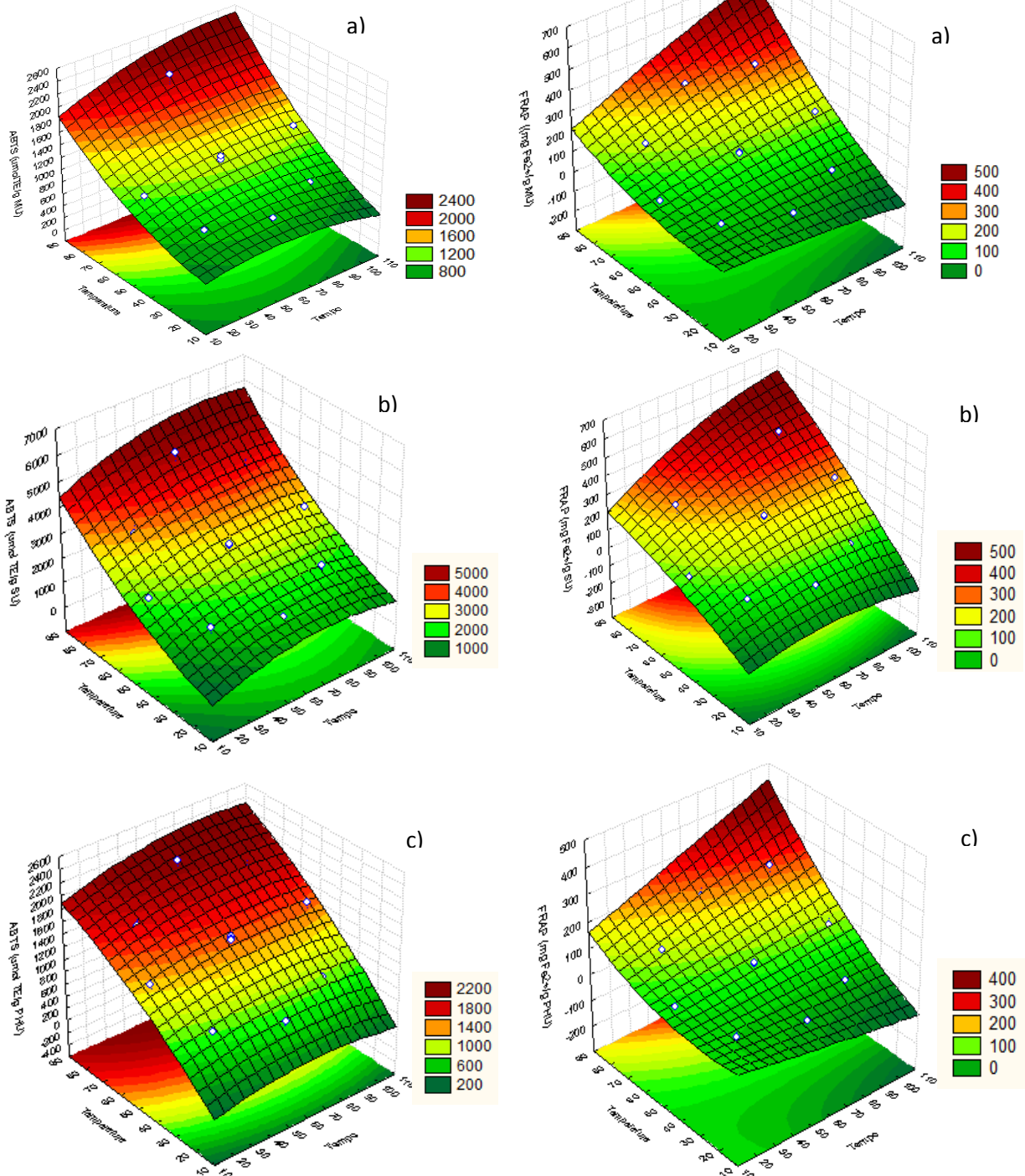


Figura 13: Gráficos de superfície obtidos tendo como variável de resposta o poder antioxidante pelos métodos ABTS e FRAP obtidos para os três extratos: a) MU, b) SU e c) PHU.

Tendo ainda em conta também o método DPPH, é possível comparar os resultados obtidos (valores de EC<sub>50</sub>) nos extratos da otimização com os resultados obtidos anteriormente na secção 4.1 (bioatividades). Tendo em atenção que o solvente é diferente, os extratos da otimização foram extraídos em etanol:água 50:50 v/v, enquanto os extratos para avaliação das bioatividades foram realizados em metanol:água 80:20 v/v. Na **Tabela 11** estão representados os valores de EC<sub>50</sub> obtidos (média±DP) em cada extrato, para cada ensaio da otimização.

**Tabela 11: Atividade antioxidante pelo método DPPH, valores de EC<sub>50</sub> obtidos (média±DP) para os extratos em estudo.**

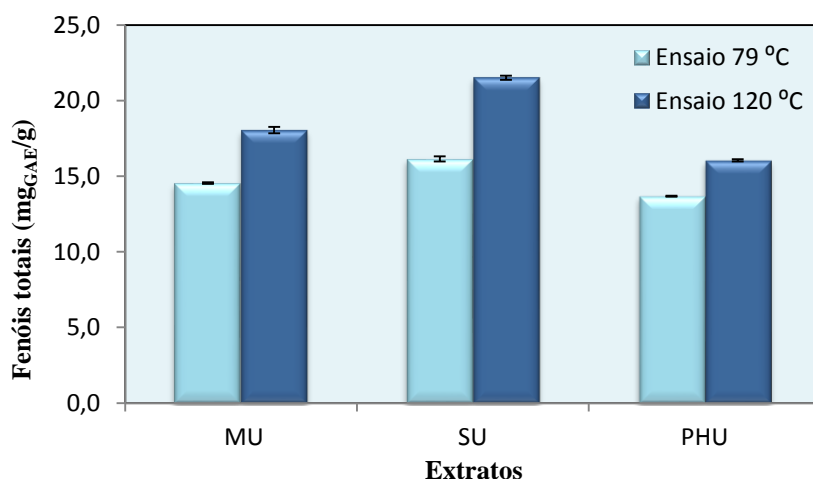
Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	EC <sub>50</sub> (g/L)		
			MU	SU	PHU
1	30	30	0,22 ± 0,04	0,17 ± 0,02	0,51 ± 0,20
2	30	70	0,16 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,20 ± 0,04
3	90	30	0,25 ± 0,07	0,19 ± 0,00	0,38 ± 0,06
4	90	70	0,14 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,15 ± 0,02
5	18	50	0,26 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,28 ± 0,03
6	102	50	0,29 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,27 ± 0,00
7	60	22	0,29 ± 0,01	0,24 ± 0,03	0,51 ± 0,02
8	60	79	0,12 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,14 ± 0,00
9	60	50	0,20 ± 0,02	0,11 ± 0,00	0,20 ± 0,03
10	60	50	0,16 ± 0,01	0,11 ± 0,00	0,21 ± 0,04
11	60	50	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,21 ± 0,03
12	60	50	0,14 ± 0,02	0,11 ± 0,00	0,22 ± 0,01

De acordo com os resultados acima referidos, o extrato que apresenta maior atividade antioxidante é o extrato SU, seguido do MU e PHU. Para todos os extratos, o valor de EC<sub>50</sub> mais baixo (representa maior atividade antioxidante) foi obtido a 79 °C (0,12 g/L, 0,08 g/L e 0,14 g/L extratos MU, SU e PHU respetivamente), enquanto os ensaios com menor atividade foram obtidos a 22 °C (0,29 g/L, 0,24 g/L e 0,51 g/L extrato MU, SU e PHU respetivamente).

Os resultados obtidos no ensaio 8 para os extratos MU e SU (0,12 g/L e 0,08 g/L, respetivamente) são similares aos obtidos em 4.1 para os extratos MU e SU (0,123 e 0,023 g/L), ao contrário do extrato PHU que apresentou valor de EC<sub>50</sub> mais elevado (0,563 g/L) comparado ao obtido usando etanol a 50% v/v (0,14 g/L).

#### 4.4 Extração com Lactato de Etilo

Em seguimento dos resultados obtidos na tentativa de otimização do tempo e temperatura, as extrações usando o lactato de etilo como solvente, foram realizadas para todos os extratos em triplicado no ponto máximo de temperatura determinado pelo desenho experimental (79 °C durante 60 min), em duplicado a 120 °C durante 60 min e apenas um ensaio a 120 °C durante 120 min. Devido à escassa quantidade de extratos disponíveis, não foi possível realizar o duplicado a 120 °C e 120 min. Na **Figura 14** estão representados os valores (média±DP) referentes ao teor de fenóis (média±DP) presentes nos extratos extraídos a 79 °C e 120 °C durante 60 min.



**Figura 14:** Teor de fenóis totais obtidos nas extrações com lactato de etilo, a 79 e 120 °C.

Uma das alterações visíveis a olho nu foi a alteração de cor dos extratos. Usando o lactato de etilo como solvente, os extratos apresentaram uma coloração amarela pálido (SU) e esverdeado (misturas MU e PHU), ao contrário dos extratos obtidos usando como solvente a combinação etanol:água 50:50 v/v.

De acordo com os resultados obtidos, aumentando a temperatura para 120 °C é visível um aumento significativo do teor de fenóis para todos os extratos em estudo. O extrato MU aumentou de 14,55 para 18,05 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>MU</sub>, o extrato SU aumentou de 16,15 para 21,52 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>SU</sub> e por último o extrato PHU de 13,68 para 16,05 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>PHU</sub>.

Como referido anteriormente, foi também realizado um ensaio a 120 °C durante 120 min a fim de se verificar alterações no teor de fenóis com o aumento do tempo de

extração. Os resultados obtidos (média±DP) são comparados com os obtidos anteriormente e estão representados na **Tabela 12**.

**Tabela 12:** Teor de fenóis<sup>1</sup> totais obtidos (média±DP) nas extrações com lactato de etilo a 120 °C, durante 60 e 120 minutos

Extratos	120 °C	
	60 min	120 min
MU	18,05 ± 0,21	22,45
SU	21,52 ± 0,14	24,16
PHU	16,05 ± 0,07	17,58

<sup>1</sup>Teor de fenóis totais expressos em (mg<sub>GAE</sub>/g<sub>extrato</sub>)

Tendo em consideração os resultados apresentados na tabela anterior, é perceptível um aumento no teor de fenóis totais em todos os extratos. O teor de fenóis totais aumentou cerca de 24,4% para o extrato MU, 12,3% para o extrato SU e 9,5% para o extrato PHU. Facilmente se compreende que seriam necessários mais ensaios a fim de verificar se o aumento do tempo (com intervalos de 60 min) aumentaria o teor de fenóis totais, ou se, extrações aumentando apenas a variável temperatura durante 60 min, seria mais adequado tendo em conta o teor de fenóis totais obtidos.

Estudos análogos a este foram encontrados na literatura. Lores *et al.* (2015) usaram o lactato de etilo (EL) 50% v/v em água e o metanol (MeOH) 50% v/v em água, para extração (PLE) de compostos fenólicos presentes na planta *Cytisus scoparius* e nas suas diferentes componentes. Os autores estudaram as diferenças no perfil fenólico, atividade antioxidante e teor de fenóis totais entre os extratos EL e MeOH. Concluíram que o teor de fenóis totais obtidos a 120 °C usando EL (34,24 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>extrato seco</sub>) é superior ao teor obtido usando MeOH (31,73 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>extrato seco</sub>) nas mesmas condições. A fim de verificar alteração no teor de fenóis, aumentaram a temperatura dos ensaios com EL para 180 °C e verificaram que o teor aumentou para cerca de 61,96 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>extrato seco</sub>. Contudo, sendo a temperatura de 120 °C ainda distante do limite do equipamento usado (200 °C) é suficiente para obter uma quantidade desejada de fenóis e uma extração eficiente que permite uma caracterização adequada dos extratos. Um estudo semelhante

---

foi realizado por Bermejo *et al.* (2013) sendo avaliado o efeito do lactato de etilo ( $\geq 98$  % pureza) e do etanol (99,5% (v/v) pureza) a diferentes temperaturas (100, 150 e 200 °C) para extração de compostos fenólicos a partir de grãos de café (família *Rubiaceae*). Os autores observaram que o teor de fenóis totais usando lactato de etilo a 100, 150 e 200 °C (106,4; 117,7 e 126,7 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>extrato</sub>, respectivamente) foi superior ao obtido pelo etanol nas mesmas temperaturas (89,7; 98,4 e 139,1 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>extrato</sub>). Em suma, na literatura é sugerido que trabalhando a temperaturas mais elevadas o teor de fenóis obtidos será maior usando o lactato de etilo.

Devido à inexistência de extratos em estudo, não foi possível a realização de mais ensaios a fim de se verificar diferenças no teor de fenóis totais a temperaturas acima dos 120 °C.

---

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos relativos às propriedades biológicas dos extratos do bagaço da uva nomeadamente, atividades antioxidante, citotóxica e antimicrobiana, foram satisfatórios e concordantes com os resultados indicados pela literatura. Sendo em particular, o extrato das sementes o que mais atividade apresentou. Espera-se assim que no futuro este resíduo proveniente da indústria vinícola, seja devidamente valorizado e explorado pelas indústrias alimentar e farmacêutica.

No que se refere à identificação e quantificação de compostos fenólicos presentes nos extratos hidrometanólicos, os resultados foram unânimes com a literatura, sendo o composto presente em maior quantidade nas peles o hexósido do ácido *p*-cumárico, enquanto que nas sementes e mistura do bagaço os compostos presentes em maior quantidade são derivados da (epi)catequina. Relativamente aos compostos antocianínicos, foram identificados derivados de antocianinas os mais comuns entre os identificados pela literatura em estudos semelhantes com a *Vitis vinifera* L.

A otimização do processo de extração teve em conta apenas o teor de fenóis totais, porém não foi alcançado com o sucesso global desejado. Os resultados em geral indicaram que seria necessário trabalhar em intervalos de tempo maiores e a temperaturas um pouco acima dos 70 °C. Será necessária a elaboração de um novo desenho experimental a fim de se certificar e validar os resultados. O processo é então uma primeira aproximação na tentativa da otimização, mas fornecendo informação muito útil e de elevada importância.

O último objetivo do estudo foi a extração usando um solvente mais verde, usando o lactato de etilo, o qual revelou ser um bom solvente para este tipo de extratos, contudo o seu desempenho mostrou ser máximo a temperaturas ainda acima dos 120 °C.

---

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aghbali, A., Hosseini, S. V., Delazar, A., Gharavi, N. K., Shahneh, F. Z., Orangi, M., Baradaran, B. (2013). Induction of apoptosis by grape seed extract (*Vitis vinifera*) in oral squamous cell carcinoma. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences / Udruženje Basičnih Mediciniskih Znanosti = Association of Basic Medical Sciences*, 13(3), 186–91.
- Alves, C. Q., David, J. M., David, J. P., Bahia, M. V., & Aguiar, R. M. (2010). Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Quimica Nova*, 33(10), 2202–2210.
- Bakker, J., Preston, N. W., & Timberlake, C. F. (1986). The Determination of Anthocyanins in Aging Red Wines: Comparison of HPLC and Spectral Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37(2), 121–126.
- Bartolomé, B., Nunez, V., Monagas, M., & Gomez-Cordovés, C. (2004). In vitro antioxidant activity of red grape skins. *European Food Research and Technology*, 218(2), 173–177.
- Bermejo, D. V., Luna, P., Manic, M. S., Najdanovic-Visak, V., Reglero, G., & Fornari, T. (2013). Extraction of caffeine from natural matter using a bio-renewable agrochemical solvent. *Food and Bioproducts Processing*, 91(4), 303–309.
- Bona, E. A. M. De, Pinto, F. G. D. S., Fruet, T. K., Jorge, T. C. M., & Moura, A. C. De. (2014). Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Pharmacology*, 81(3), 218–225.
- Borges, L. L., Lúcio, T. C., Gil, E. D. S., & Barbosa, E. F. (2011). Uma abordagem sobre Métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. *Enciclopédia Biosfera*, 7(12), 1–20.
- Bozan, B., Tosun, G., & Özcan, D. (2008). Study of polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antiradical activity. *Food Chemistry*, 109(2), 426–430.

- 
- Brambilla, A., Lo Scalzo, R., Bertolo, G., & Torreggiani, D. (2008). Steam-blanching highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) juice: Phenolic profile and antioxidant capacity in relation to cultivar selection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8), 2643–2648.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–333.
- Cabrita, M. J., Ricardo-da-Silva, J., & Laureano, O. (1999). Os Compostos Polifenólicos Das Uvas E Dos Vinhos. *I Seminário Internacional de Vitivinicultura*, 61–102.
- Cádiz-Gurrea, M. D. L. L., Borrás-Linares, I., Lozano-Sánchez, J., Joven, J., Fernández-Arroyo, S., & Segura-Carretero, A. (2017). Cocoa and grape seed byproducts as a source of antioxidant and anti-inflammatory proanthocyanidins. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2).
- Carson, C. F., Hammer K.A., & Riley T.V. (1995). Broth micro-dilution method for determination of susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to ..., (February 1995), 181–185.
- Charalampia, D., & Koutelidakis, A. (2016). Value added alternatives of winemaking process residues: A health based oriented Grape Pomace: A Challenging Renewable Resource of Bioactive Phenolic Compounds with Diversified Health Benefits, (October).
- Corrêa, R. C. G., Haminiuk, C. W. I., Barros, L., Dias, M. I., Calhelha, R. C., Kato, C. G., ... Ferreira, I. C. F. R. (2017). Stability and biological activity of Merlot (*Vitis vinifera*) grape pomace phytochemicals after simulated in vitro gastrointestinal digestion and colonic fermentation. *Journal of Functional Foods*, 36(July), 410–417.
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313–7352.
- Dallas, C., Richardo-da-Silva, J. M., & Laureano, O. (1995). Degradation of oligomeric and polymeric procyanidins and anthocyanins in a Tinta Roriz red wine

- 
- during maturation. *Vitis*, 34(1), 51–56.
- Damianaki, A., Bakogeorgou, E., Kampa, M., Notas, G., Hatzoglou, A., Panagiotou, S., Castanas, E. (2000). Potent Inhibitory Action of Red Wine Polyphenols on Human Breast Cancer Cells, *441*, 429–441.
- Dani, C., Oliboni, L. S., Vanderlinde, R., Pra, D., Dias, J. F., Yoneama, M. L., Henriques, J. a P. (2009). Antioxidant activity and phenolic and mineral content of rose grape juice. *Journal of Medicinal Food*, 12(1), 188–192.
- Dashwood, R. H. (2007). Frontiers in Polyphenols and Cancer Prevention. *The Journal of Nutrition*, 267–269.
- Dias, M. I., Barros, L., Dueñas, M., Pereira, E., Carvalho, A. M., Alves, R. C., ... Ferreira, I. C. F. R. (2013). Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium* L. and bioactivity of the methanolic extract, infusion and decoction. *Food Chemistry*, 141(4), 4152–4160.
- Downey, M. O., & Rochfort, S. (2008). Simultaneous separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectral identification of anthocyanins and flavonols in Shiraz grape skin. *Journal of Chromatography A*, 1201(1), 43–47.
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B. J., Boobis, A., ... Kleiner, J. (2002). Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, 40(2–3), 193–236.
- Ekwall, B., Silano, V., & Zucco, F. (1990). Chapter 7 - Toxicity Tests with Mammalian Cell Cultures. *Short-Term Toxicity Tests for Non-Genotoxic Effects*, 75–98.
- Fontana, A. R., Antonioli, A., & Bottini, R. (2013). Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(38), 8987–9003.
- Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y., & Jo, I. H. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from

- 
- grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4988–4994.
- Gonçalves, G. A., Soares, A. A., Correa, R. C. G., Barros, L., Haminiuk, C. W. I., Peralta, R. M., ... Bracht, A. (2017). Merlot grape pomace hydroalcoholic extract improves the oxidative and inflammatory states of rats with adjuvant-induced arthritis. *Journal of Functional Foods*, 33(June), 408–418.
- Grace Nirmala, J., & Narendhirakannan, R. T. (2011). In vitro antioxidant and antimicrobial activities of grapes (*Vitis vinifera*. L) seed and skin extracts - Muscat variety. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(4), 242–249.
- Gruz, A. P., Silva e Sousa, C. G., Torres, A. G., Freitas, S. P., & Cabral, L. M. C. (2013). Recovery of bioactive compounds from grape pomace. *Revista Brasileira de Fruticultura*, (March 2016), 1147–1157.
- Huang, D., Boxin, O. U., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856.
- Jayaprakasha, G. K., Selvi, T., & Sakariah, K. K. (2003). Antibacterial-and-antioxidant-properties-of-GSE.pdf, pp. 117–122.
- Karakaya, S. (2004). Bioavailability of phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(6), 453–464.
- Kennedy, J. A., Matthews, M. A., & Waterhouse, A. L. (2000). Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry*, 55(1), 77–85.
- Lambert, R. J., & Pearson, J. (2000). Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of Applied Microbiology*, 88(5), 784–790.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453–462.
- Leng, Y., Gan, S., Morris, A., & Kiat, H. (2016). Ethyl lactate as a potential green

- 
- solvent to extract hydrophilic ( polar ) and lipophilic ( non-polar ) phytonutrients simultaneously from fruit and vegetable by-products. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 4, 21–31.
- Lores, M., Pájaro, M., Álvarez-Casas, M., Domínguez, J., & García-Jares, C. (2015). Use of ethyl lactate to extract bioactive compounds from *Cytisus scoparius*: Comparison of pressurized liquid extraction and medium scale ambient temperature systems. *Talanta*, 140(August), 134–142.
- Lorrain, B., Ky, I., Pechamat, L., & Teissedre, P. L. (2013). Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines, and extracts. *Molecules*, 18(1), 1076–1100.
- Makris, D. P., Boskou, G., & Andrikopoulos, N. K. (2007). Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2), 125–132.
- Mané, C., Souquet, J. M., Ollé, D., Verriés, C., Véran, F., Mazerolles, G., ... Fulcrand, H. (2007). Optimization of simultaneous flavanol, phenolic acid, and anthocyanin extraction from grapes using an experimental design: Application to the characterization of champagne grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(18), 7224–7233.
- Melo, E. D. A., Maciel, M. I. S., Lima, V. L. A. G., Leal, F. L. L., Caetano, A. C. D. S., & Nascimento, R. J. (2006). Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 26(3), 639–644.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clinical Science*, 84(4), 407–412.
- Murthy, K. N.C., Singh, R. P., & Jayaprakasha, G. K. (2002). Antioxidant Activities of Grape *Vitis vinifera* Pomace Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5909–5914.
- Naczka, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1–2), 95–111.

- 
- Nechita, A., Cotea, V. V., Nechita, C. B., Pincu, R. R., Mihai, C. T., & Colibaba, C. L. (2012). Study of cytostatic and cytotoxic activity of several polyphenolic extracts obtained from *Vitis vinifera*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40(1), 216–221.
- Oliveira, D. A., Salvador, A. A., Smânia, A., Smânia, E. F. A., Maraschin, M., & Ferreira, S. R. S. (2013). Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. *Journal of Biotechnology*, 164(3), 423–432.
- Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10–36.
- Pastrana-Bonilla, E., Akoh, C. C., Sellappan, S., & Krewer, G. (2003). Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5497–5503.
- Paul, S., Pradhan, K., & R.Das, A. (2016). Ethyl Lactate as a Green Solvent : A Promising Bio-Compatible Media for Organic Synthesis Ethyl Lactate As a Green Solvent : A Promising Bio-compatible Media for. *Current Green Chemistry*, 111–118. h
- Pereira, C. S. M., Silva, V. M. T. M., & Rodrigues, E. (2011). Green Chemistry Ethyl lactate as a solvent : Properties , applications and production processes – a review, (June 1979), 2658–2671.
- Pinelo, M., Del Fabbro, P., Manzocco, L., Nuñez, M. J., & Nicoli, M. C. (2005). Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chemistry*, 92(1), 109–117.
- Planinic, M., Aliakbarian, B., Perego, P., Greganic, K., Tomas, S., & Bucic-Kojic, A. (2015). Influence of Temperature and Drying Time on Extraction Yield of Phenolic Compounds from Grape Pomace Variety “Portogizac.” *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 29(3), 343–350.
- Rathi, P., & Rajput, C. S. (2014). Mini Review Antioxidant Potential of Grapes ( *Vitis vinifera*): A Review. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 39(6), 1682–1691.

- 
- Ribeiro, L. F., Ribani, R. H., Francisco, T. M. G., Soares, A. A., Pontarolo, R., & Haminiuk, C. W. I. (2015). Profile of bioactive compounds from grape pomace (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) by spectrophotometric, chromatographic and spectral analyses. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1007(September), 72–80.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287–306.
- Simon, S., Malinovski, L. I., Panceri, C. P., Brighenti, A. F., Vanderlinde, G., Bordignon-Luiz, M. T., & Silva, A. L. (2017). Productive and qualitative characterization of “Merlot” grapes (*Vitis vinifera* L.) in Campo Belo do Sul, Santa Catarina State, Brazil. *Acta Horticulturae*, (1157), 337–342.
- Sin, M. H., A.S., M., Aslam, M. S., & Ahmad, M. S. (2017). Total phenolic content and anti-oxidant potential of *Ficus deltoidea* using green and non- green solvents Total phenolic content and anti-oxidant potential of *Ficus deltoidea* using green and non-green solvents. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 8(April).
- Singleton V. L., & Rossi J. A. Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.*, 144–58.
- Spencer, J. P. E., Abd El Mohsen, M. M., Minihane, A.-M., & Mathers, J. C. (2008). Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *The British Journal of Nutrition*, 99(2008), 12–22.
- Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 200–208.
- Spínola, V., Pinto, J., & Castilho, P. C. (2015). Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD-ESI-MSn and screening for their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 173(April), 14–30.

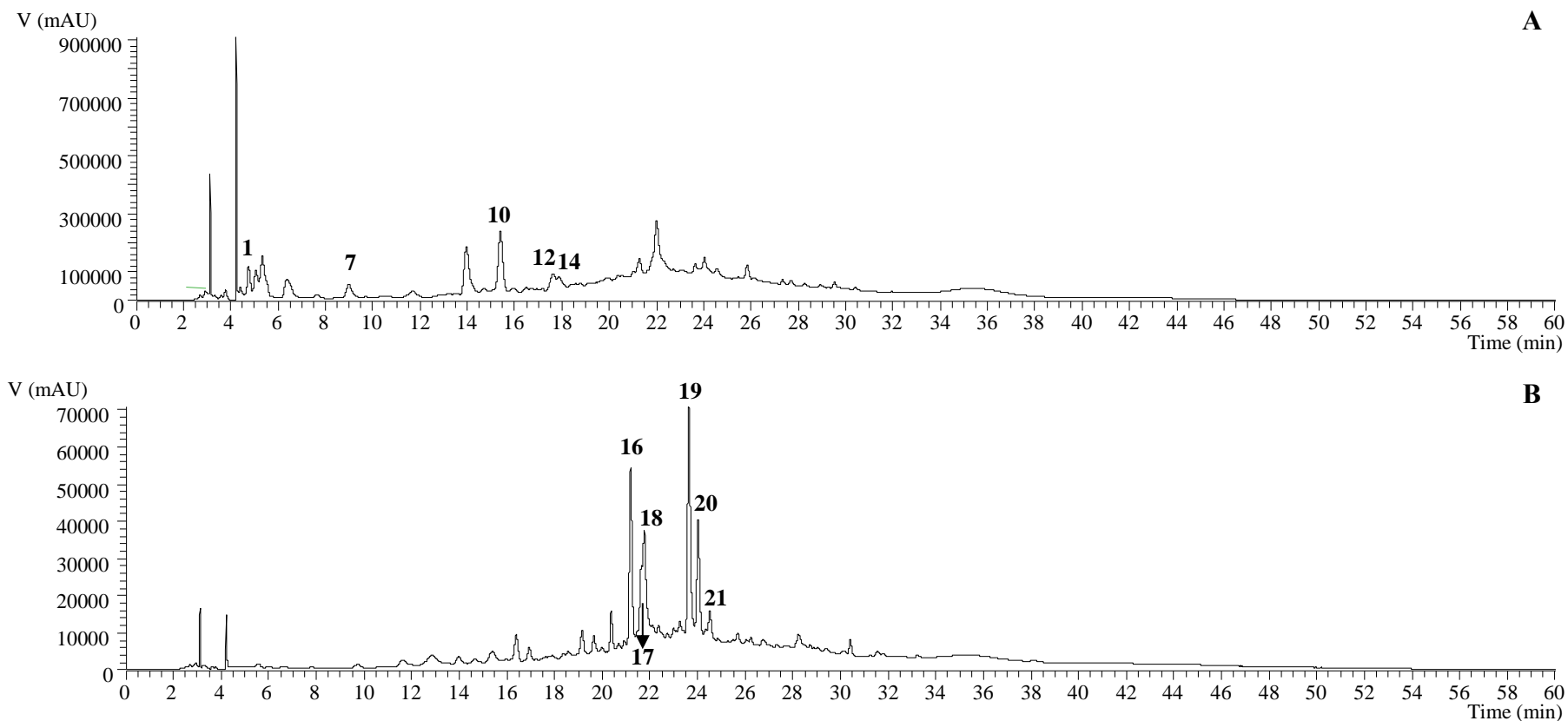
- 
- Terral, J. F., Tabard, E., Bouby, L., Ivorra, S., Pastor, T., Figueiral, I., ... This, P. (2010). Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. *Annals of Botany*, *105*(3), 443–455.
- Vasconcelos, S. M. L., Goulart, M. O. F., Moura, J. B. D. F., Manfredini, V., Benfato, M. D. S., & Kubota, L. T. (2007). Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. *Quimica Nova*, *30*(5), 1323–1338.
- Vermerris, W., & Nicholson, R. (2009). *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer (Vol. 53).
- Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, *1*(3), 1112–1116.
- Wang, L.S., Stoner, G. . (2008). Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*, *269*(2), 281–290.
- Xia, E., He, X., Li, H., Wu, S., Li, S., & Deng, G. (2010). Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *Polyphenols in Human Health and Disease*, *1*, 622–646.
- Yilmaz, Y., & Toledo, R. T. (2004a). Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends in Food Science and Technology*, *15*(9), 422–433.
- Yilmaz, Y., & Toledo, R. T. (2004b). Major Flavonoids in Grape Seeds and Skins : Antioxidant Capacity of Catechin , Epicatechin , and Gallic Acid Major Flavonoids in Grape Seeds and Skins : Antioxidant Capacity of Catechin , Epicatechin , and Gallic Acid.
- Young, I. S., & Woodside, J. V. (2014). Antioxidants in health and disease. *Bratislavsa Lekarske Listy*, *115*(10), 603–606.
- Yu, J., & Ahmedna, M. (2013). Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science and Technology*, *48*(2), 221–237.

---

## **7. ANEXOS**

## Anexo A

### Perfil Cromatográfico da Mistura do Bagaço da Uva (MU)



**Figura A.1:** Cromatograma de HPLC obtidos a 280 nm (A) e 370 nm (B) relativos ao perfil fenólico dos extratos hidrometanólicos da mistura do bagaço da uva (MU).

## Perfil Cromatográfico das Sementes do Bagaço da Uva (SU)

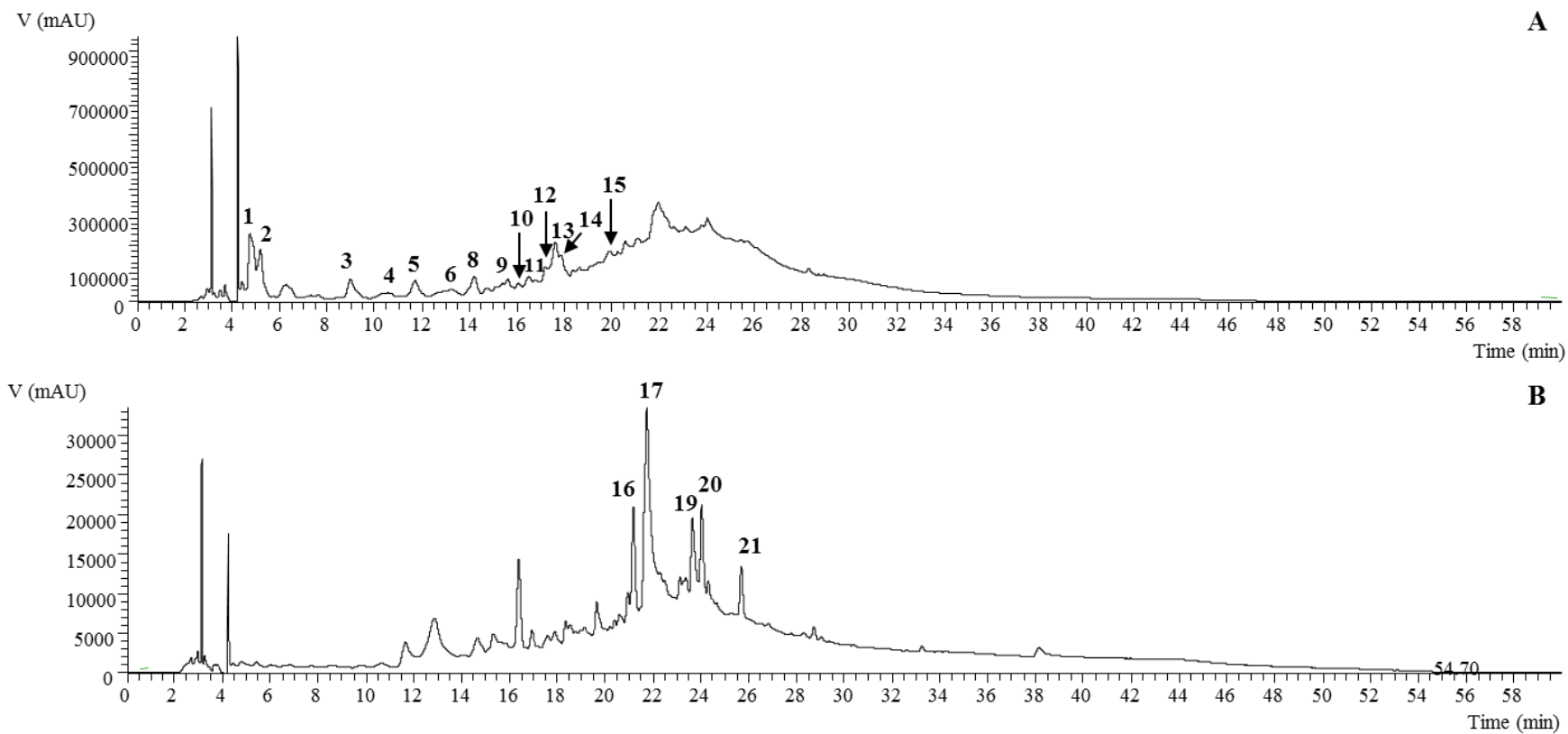
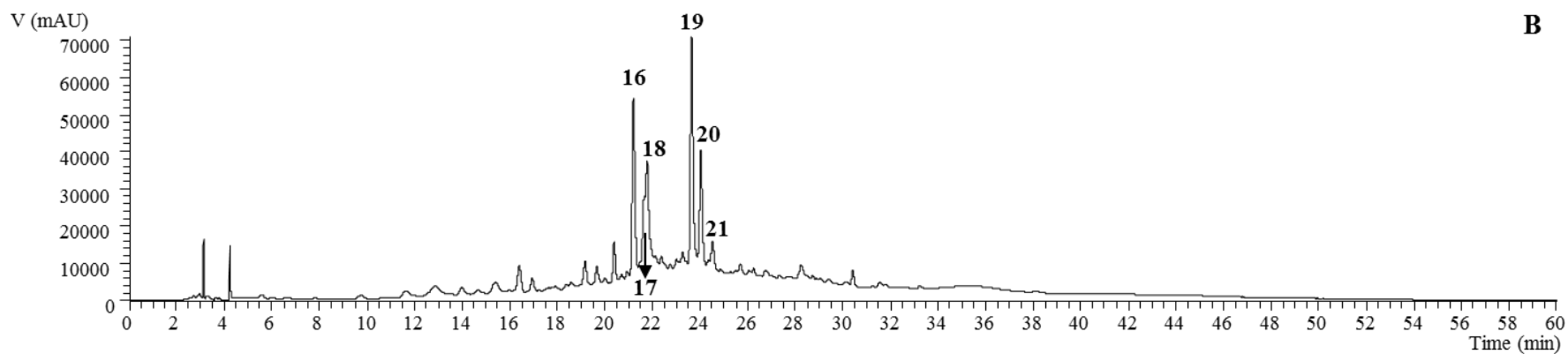
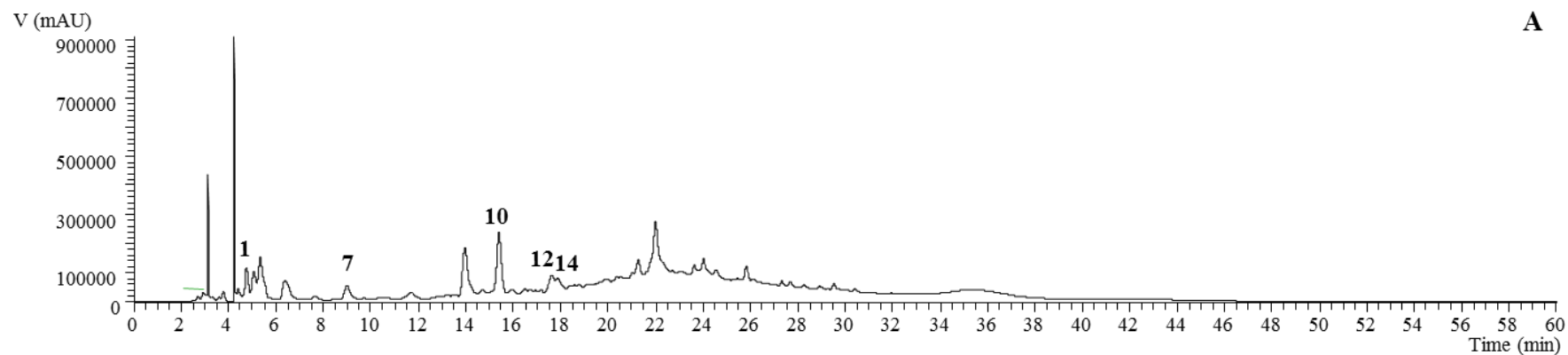


Figura A.2: Cromatograma de HPLC obtidos a 280 nm (A) e 370 nm (B) relativos ao perfil fenólico dos extratos hidrometanólicos de sementes do bagaço da uva (SU).

### Perfil Cromatográfico da Mistura de Peles e Hastes do Bagaço da Uva (PHU)



**Figura A.3:** Cromatograma de HPLC obtidos a 280 nm (A) e 370 nm (B) relativos ao perfil fenólico dos extratos hidrometanólicos da mistura de peles e hastes do bagaço da uva (PHU).

## Anexo B

Tabela B.1: Rendimento de extração, valores de EC<sub>50</sub> e teor de fenóis totais obtidos no ensaio a 30 °C usando os vários solventes em estudo.

Solvente	Rendimento de extração (%)	EC <sub>50</sub> (g/L)	Fenóis totais (mg <sub>GAE</sub> /g <sub>extrato</sub> )
Água	8.60 ± 0.10	4.84 ± 0.51	5.79 ± 0.03
EtOH:H <sub>2</sub> O 20:80 v/v	7.66 ± 0.75	1.30 ± 0.12	7.03 ± 0.03
EtOH:H <sub>2</sub> O 50:50 v/v	6.95 ± 0.04	0.24 ± 0.01	11.54 ± 0.18
EtOH:H <sub>2</sub> O 80:20 v/v	5.76 ± 0.30	0.27 ± 0.01	9.74 ± 0.07
Etanol 96%	15.10 ± 0.10	1.95 ± 0.05	10.23 ± 0.01

Tabela B.2: Rendimento de extração, valores de EC<sub>50</sub> e teor de fenóis totais obtidos no ensaio a 50 °C usando os vários solventes em estudo

Solvente	Rendimento de extração (%)	EC <sub>50</sub> (g/L)	Fenóis totais (mg <sub>GAE</sub> /g <sub>extrato</sub> )
Água	8.72 ± 0.20	2.57 ± 0.04	6.90 ± 0.09
EtOH:H <sub>2</sub> O 20:80 v/v	8.65 ± 0.55	1.48 ± 0.19	10.20 ± 0.30
EtOH:H <sub>2</sub> O 50:50 v/v	9.45 ± 0.05	0.15 ± 0.01	19.70 ± 0.20
EtOH:H <sub>2</sub> O 80:20 v/v	6.55 ± 0.45	0.18 ± 0.01	13.35 ± 0.15
Etanol 96%	17.20 ± 0.30	1.48 ± 0.14	11.35 ± 0.05