

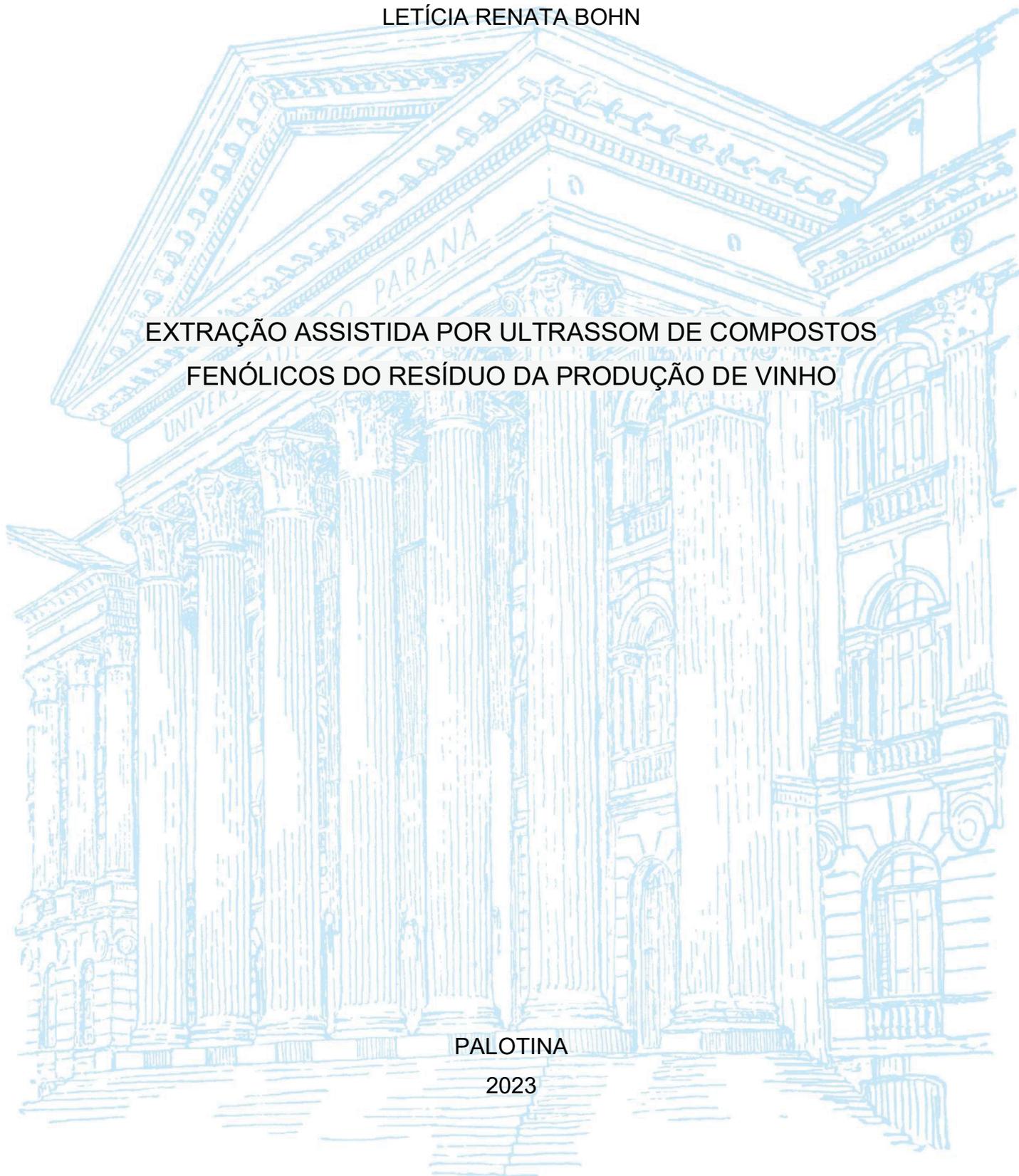
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETÍCIA RENATA BOHN

EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE COMPOSTOS
FENÓLICOS DO RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE VINHO

PALOTINA

2023



LETÍCIA RENATA BOHN

EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO
RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE VINHO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia Ambiental, Setor de Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Joel Gustavo Teleken

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Martinez Mibielli

PALOTINA

2023

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.
Biblioteca UFPR Palotina.

B677

Bohn, Leticia Renata

Extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos do resíduo da produção de vinho / Leticia Renata Bohn
. – Palotina, PR, 2023.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, PR, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Joel Gustavo Teleken.

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Martinez Mibielli.

1. Bagaço de uva. 2. Compostos bioativos. 3. Otimização.
I. Teleken, Joel Gustavo. II. Mibielli, Guilherme Martinez.
III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 663.2

Bibliotecária: Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **LETÍCIA RENATA BOHN** intitulada: **EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS ASSISTIDA POR ULTRASSOM DO RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE VINHO**, sob orientação do Prof. Dr. JOEL GUSTAVO TELEKEN, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Palotina, 03 de Março de 2023.

Assinatura Eletrônica

07/03/2023 10:33:22.0

JOEL GUSTAVO TELEKEN

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

07/03/2023 13:55:39.0

WAGNER LUIZ PRIAMO

Avaliador Externo (INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO RIO GRANDE DO SUL)

Assinatura Eletrônica

07/03/2023 13:26:37.0

JOAO PAULO BENDER

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL)

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

AGRADECIMENTOS

-À Universidade Federal do Paraná e aos professores do PPGETA – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia Ambiental;

-Ao meu orientador Prof. Dr. Joel Gustavo Teleken, pela ajuda e disponibilidade;

- Ao meu coorientador Prof. Dr. Guilherme M. Mibielli, pela confiança no meu trabalho, paciência e exigência que sempre me fizeram amadurecer pessoalmente e profissionalmente;

- Aos professores do laboratório de resíduos sólidos da UFFS, pelas suas importantes participações na discussão do trabalho, pela paciência e ajuda das mais diversas formas no decorrer da realização deste trabalho;

-Aos colegas do laboratório de resíduos sólidos da Universidade Federal da Fronteira Sul, em especial à Aline P. Dresch, pelas horas de laboratório compartilhadas e pelo auxílio durante a execução dos experimentos;

-Ao técnico da UFFS Odinei Fogolari, pela disponibilidade e engajamento para a realização das análises de HPLC;

-À Prof. Dra. Margarete Dulce Bagattini e sua aluna Daiane Manica que, desde o início, se prontificaram a participar e a contribuir com esta pesquisa.

RESUMO

O Brasil é um país de grande atividade agrícola e um dos países que mais produz resíduos agroindustriais, como o bagaço de uva. O bagaço de uva é um subproduto abundante da indústria do vinho que consiste no resto das cascas, sementes e caules. Estima-se que este resíduo represente cerca de 30% da massa total da uva utilizada no processo de vinificação. A destinação mais comumente empregada desse resíduo é a compostagem ou ração animal. Considerando que tais resíduos são ricos em compostos bioativos, amplamente reconhecidos por suas propriedades promotoras de saúde e aplicações tecnológicas, a extração dessas substâncias representa uma alternativa para a obtenção de produtos de alto valor agregado que podem ser utilizados como ingredientes nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. Dessa forma, este estudo visa avaliar o processo de obtenção de compostos fenólicos a partir de resíduos de vinificação por meio de extração assistida por ultrassom e avaliar a aplicação tecnológica para o mesmo. A matéria-prima coletada em uma vinícola do oeste de Santa Catarina foi tratada termicamente, seca, triturada e caracterizada quanto ao teor de umidade e tamanho de partículas. Avaliou-se o tempo de extração através de uma cinética e a análise das variáveis do processo deu-se por meio de um DCCR, onde foram estudadas as variáveis de extração: temperatura, razão sólido/líquido, concentração de solvente e potência de ultrassom. Para todos os ensaios foram realizadas as análises de compostos fenólicos totais, perfil fenólico e atividade antioxidante. A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu e a atividade antioxidante pelos métodos DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro). Já para o perfil fenólico utilizou-se um cromatógrafo líquido acoplado ao detector de massa (HPLC-MS). A partir do planejamento experimental, validou-se, estatisticamente e experimentalmente, o modelo matemático para a análise de Compostos Fenólicos Totais, no qual apenas a variável razão sólido/líquido possui efeito significativo. O melhor resultado para CFT foi de $51,21 \pm 7,57$ mgAG/g_{biomassa}; nas condições de extração: 50 °C, 40 % etanol, 4 g_{biomassa}/L e 60 % de potência de ultrassom. Esse ensaio resultou em $59,09 \pm 5,85$ µmolTE/g_{biomassa} de atividade antioxidante pelo método DPPH e $516,21 \pm 17,08$ µMSF/g_{biomassa} pelo método FRAP. A partir dessa melhor condição, realizou-se uma extração em maior volume. O extrato obtido foi liofilizado e caracterizado quando seu perfil fenólico, no qual o ácido siríngico foi o composto identificado em maior concentração. Posteriormente o extrato foi avaliada quando a sua viabilidade celular e de estresse oxidativo, demonstrando potencial positivo para uso em células humanas.

Palavras-chave: Bagaço de uva. Compostos bioativos. Otimização.

ABSTRACT

Brazil is a country of great agricultural activity and one of the countries that most produces agro-industrial residues such as grape pomace. Grape pomace is an abundant by-product of the wine industry consisting of the rest of the skins, seeds and stems. It is estimated that this residue represents about 30% of the total weight of the grape used in the winemaking process. The most used destination for this residue is composting or animal feed. Considering that such residues are rich in bioactive compounds, widely recognized for their health-promoting properties and technological applications, the extraction of these substances represents an alternative for obtaining products with high added value that can be used as ingredients in the food, cosmetics and pharmaceutical industries. Thus, this study aims to optimize the process of obtaining phenolic compounds from winemaking residues through ultrasound-assisted extraction. Initially the raw material was collected in a winery in the west of Santa Catarina. It underwent heat treatment, drying, crushing and characterization regarding moisture content and particle size. The extraction time was optimized through kinetics and the process optimization was performed through a DCCR, where the extraction variables were evaluated: temperature, solid/liquid ratio, solvent concentration and ultrasound power. For all tests the analysis of total phenolic compounds, phenolic profile and antioxidant activity was performed. The quantification of total phenolic compounds was performed by the Folin-Ciocalteu method, the antioxidant activity by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and FRAP (Antioxidant Power of Iron Reduction) methods. For the phenolic profile, a liquid chromatograph coupled to a mass detector (HPLC-MS) was used. In the process optimization analysis, the mathematical model for the analysis of Total Phenolic Compounds was statistically and experimentally validated, in which only the variable solid/liquid ratio has a significant effect. The best result for CFT was 51.21 ± 7.57 mgAG/gbiomass, under the following extraction conditions: 50 °C, 40% ethanol, 4 gbiomass/L, and 60% ultrasonic power. This assay resulted in 59.09 ± 5.85 $\mu\text{molTE/gbiomass}$ of antioxidant activity by the DPPH method and 516.21 ± 17.08 $\mu\text{MSF/gbiomass}$ by the FRAP method. Based on this optimal condition, a larger volume extraction was performed. The obtained extract was freeze-dried and characterized for its phenolic profile, in which syringic acid was the compound identified at the highest concentration. Subsequently, the extract was evaluated for its cell viability and oxidative stress, demonstrating positive potential for use in human cells.

Keywords: Grape pomace. Bioactive compounds. Optimization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- PROCESSOS DE VINIFICAÇÃO NO BRASIL	20
Figura 2- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS COMPONENTES DO RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE VINHO	22
Figura 3- PRINCIPAIS APLICAÇÕES DA BIOMASSA FINAL DE UVA.....	25
Figura 4- FÓRMULA ESTRUTURAL BÁSICA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	26
Figura 5- CLASSIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS.....	27
Figura 6- ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONOIDES.....	28
Figura 7- ESTRUTURA QUÍMICA DOS FLAVONOIDES E SEUS DERIVADOS.....	29
Figura 8- ESTRUTURA GERAL DE UM TANINO CONDENSADO (A) E UM HIDROLISÁVEL (B).	31
Figura 9- FLUXOGRAMA DAS METODOLOGIAS DESENVOLVIDAS	39
Figura 10- BIOMASSA COLETADA.....	40
Figura 11- BIOMASSA APÓS SECAGEM EM ESTUFA.	43
Figura 12- APARATO PARA A DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS.....	44
Figura 13- DEMONSTRAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE EM ESTUFA.....	45
Figura 14 - TEMPO PARA CADA ETAPA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	47
Figura 15- APARATO PARA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS COM A TÉCNICA DE SOHTEX.....	50
Figura 16- FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DO EXTRATO SÓLIDO	50
Figura 17- APARATO PARA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR ULTRASSOM EM MAIOR ESCALA.....	51
Figura 18- EXTRATIVOS LIOFILIZADOS	52
Figura 19- PORCENTAGEM DE PARTÍCULAS RETIDAS EM FUNÇÃO DA ABERTURA DA PENEIRA PELA SÉRIE TYLOR	64
Figura 20-(A) BIOMASSA RETIDA NAS PENEIRAS DE 30 MESH E (B) BIOMASSA SEGREGADA PARA OS DEMAIS EXPERIMENTOS	65
Figura 21- PARETO COM OS EFEITOS PADRONIZADOS E AS INTERAÇÕES PARA COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS PELO DCCR.....	73

Figura 22- GRÁFICOS DE CONTORNO CORRELACIONANDO A VARIÁVEL TEMPERATURA	75
Figura 23- CURVA DE CONTORNO PARA AS VARIÁVEIS ULTRASSOM E RAZÃO SÓLIDO/LÍQUIDO	76
Figura 24- PARETO COM OS EFEITOS PADRONIZADOS E AS INTERAÇÕES PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DPPH	79
Figura 25- PARETO COM OS EFEITOS PADRONIZADOS E AS INTERAÇÕES PARA ÍNDICE PA PELO DCCR.....	81
Figura 26- CORRELAÇÃO DE PEARSON (R) ENTRE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL	87
Figura 27- VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS PBMCS EXPOSTAS A CRESCENTE CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO DO RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE VINHO EM 24 H.	92
Figura 28- CONCENTRAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) NAS CÉLULAS EXPOSTAS A CRESCENTE CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO DO RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE VINHO EM 24 H.....	93
Figura 29- CONCENTRAÇÃO DE NPSH PARA AS DIFERENTES CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO DO RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE VINHO EM 24 H.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AAT	-Atividade antioxidante total
AGE	-Ácido gálico equivalente
CFT	-Compostos fenólicos totais
DCCR	-Planejamento composto central rotacional
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DPPH	- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESI	- Electrospray ionization
ET	- Trolox equivalente
HPLC	- High Performance Liquid Chromatography
FRAP	-Ferric Reducing Antioxidant Power
MS	- Espectrometria de massas
NREL	- National Renewable Energy Laboratory
OIV	- Organização internacional da vinha e do vinho
P.A	- Para análise
ppm	- Parte por milhão
SC	- Santa Catarina
UFFS	- Universidade Federal da Fronteira Sul
TE	- Trolox equivalente
AG	-Ácido gálico
ERO	-Espécie reativa de oxigênio
SF	-Sulfato ferroso

LISTA DE SÍMBOLOS

® - marca registrada

/ - divisório de números

m - mili (10^{-3})

μ - micro (10^{-6})

n - nano (10^{-9})

g – grama

v - volume

°C - graus Celsius

% - porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	18
1.2 OBJETIVOS	18
1.2.1 Objetivo geral	18
1.2.2 Objetivos específicos.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 VINICULTURA	19
2.1.1 Produção de vinho no Brasil.....	19
2.1.2 Processos de produção de vinho	19
2.1.3 Resíduos da produção de vinho.....	21
2.1.4 Utilização do resíduo da produção de vinho.....	23
2.1.4.1 Farinha da casca de uva	23
2.1.4.2 Óleo de semente de uva.....	23
2.1.4.3 Fibras alimentares da casca e da semente	24
2.1.4.4 Compostos bioativos das cascas e sementes	24
2.1.4.5 Biomassa final do resíduo da produção de vinho	24
2.2 COMPOSTOS FENÓLICOS	26
2.2.1 Flavonoides	28
2.2.1.1 Flavanóis	29
2.2.1.2 Antocianidinas	30
2.2.2 Taninos.....	30
2.2.3 Estilbenos.....	31
2.2.4 Cumarinas	31
2.2.5 Ácidos fenólicos	32
2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NA UVA	32
2.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	33
2.4.1 Métodos convencionais de extração de compostos fenólicos	33
2.4.2 Métodos não convencionais de extração de compostos fenólicos	35
2.4.2.1 Extração assistida por ultrassom	35
2.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 MATERIAIS	40

3.1.1	Matéria-prima para extração dos compostos fenólicos	40
3.1.2	Reagentes	41
3.1.3	Equipamentos	41
3.1.4	Padrões cromatográficos.....	42
3.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	42
3.2.1	Preparo da biomassa para extração de compostos fenólicos	42
3.2.2	Caracterização da biomassa	44
3.2.2.1	Determinação da distribuição do tamanho das partículas	44
3.2.2.2	Determinação da umidade da biomassa	45
3.2.3	Obtenção do extrato de compostos fenólicos.....	46
3.2.3.1	Extração de compostos fenólicos da biomassa.....	46
3.2.3.2	Cinética de extração de compostos fenólicos.....	47
3.2.3.3	Planejamento experimental para analisar as condições do processo de extração	48
3.2.3.4	Validação do modelo estatístico da extração de compostos fenólicos	48
3.2.3.5	Testes complementares de extração de compostos fenólicos	48
3.2.3.6	Obtenção do extrato em maior volume.....	50
3.2.4	Determinação dos compostos fenólicos totais	52
3.2.4.1	Determinação da curva padrão para análise de compostos fenólicos totais	52
3.2.4.2	Determinação dos compostos fenólicos totais dos extratos	53
3.2.5	Avaliação da atividade antioxidante total pelo método DPPH.....	54
3.2.5.1	Determinação da curva padrão para análise de antioxidante total pelo método DPPH	54
3.2.5.2	Avaliação da atividade antioxidante total dos extratos	55
3.2.6	Cálculo do índice PA	56
3.2.7	Avaliação da atividade antioxidante total pelo método FRAP	57
3.2.7.1	Determinação da curva padrão para análise de antioxidante total pelo método FRAP.....	57
3.2.7.2	Avaliação da atividade antioxidante total dos extratos	58
3.2.8	Determinação do perfil fenólico por HPLC-MS.....	59
3.2.9	Análise estatística do planejamento experimental da extração de compostos fenólicos	60
3.2.10	Avaliação da viabilidade celular do extrato do resíduo da produção de vinho.....	60
3.2.10.1	Coleta das células mononucleares de sangue periférico (PBMCs).....	60

3.2.10.2	Avaliação da viabilidade celular.....	61
3.2.10.3	Marcadores do estresse oxidativo	61
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	63
4.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DA BIOMASSA	63
4.1.1	Distribuição granulométrica da biomassa.....	63
4.1.2	Umidade da biomassa.....	65
4.2	EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	66
4.2.1	Cinética de extração dos compostos fenólicos.....	66
4.2.2	Otimização das condições de extração com auxílio de planejamento experimental DCCR	70
4.2.2.1	Compostos Fenólicos Totais	70
4.2.2.2	Atividade Antioxidante Total pelo método DPPH.....	76
4.2.2.3	Índice PA	80
4.2.2.4	Perfil fenólico obtido por HPLC.....	82
4.2.2.5	Validação do modelo estatístico	85
4.2.3	Testes complementares para extração de compostos fenólicos	88
4.2.4	Obtenção do extrato em maior volume.....	89
4.2.5	Viabilidade dos extratos	91
4.2.5.1	Viabilidade celular.....	91
4.2.5.2	Estresse oxidativo.....	93
5	CONCLUSÃO	95
6	TRABALHOS FUTUROS.....	96
7	REFERÊNCIAS.....	97

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o 14º maior produtor de vinho do mundo, tendo registrado em 2021 uma produção de 3,6 milhões de hectolitros, em torno de 60% de aumento em relação ao ano anterior, fruto da ampliação das áreas de cultivo de uvas e agroindústrias de vinhos (ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DA VINHA E DO VINHO: OIV, 2022). O processamento da uva na indústria vinícola resulta na produção de resíduos, tanto sólidos, quanto líquidos. O bagaço é o principal subproduto gerado, o qual é separado durante as etapas de esmagamento e prensagem das uvas, estima-se uma geração de 20 a 30 % (m/m) desse resíduo em relação à massa inicial de uva utilizada no processo (BERES et al., 2017).

O aumento registrado da produção corresponde também a um aumento na quantidade de resíduos sólidos gerados, que em sua maioria, são utilizados para adubação do solo nas próprias vinícolas (BERES et al., 2017). Contudo a destinação irregular desses resíduos sólidos de forma inadequada pode provocar poluição ambiental, uma vez que liberam quantidades significativas de efluentes líquidos, os quais contêm alto teor de nutrientes, matéria orgânica e outros elementos que podem alterar o ambiente, tanto do solo como da água (SIROHI et al., 2020).

Considerando que os resíduos da viticultura são ricos em compostos bioativos, e que a maior parte dos polifenóis da uva provém das partes sólidas da uva (casca e sementes), esses resíduos podem ser uma fonte importante para obtenção de outros produtos de interesse industrial (EMBRAPA, 2018). O produto pioneiro e mais tradicional da utilização do bagaço de uva é o óleo de semente, que no Brasil ainda tem uma produção muito pequena, porém é o coproduto mais valorizado dos resíduos da cadeia da uva até o momento, sendo utilizado principalmente como cosmético (EMBRAPA, 2018). A utilização de outras frações de resíduos ainda é limitada, demonstrando o potencial existente para agregar valor a este material.

Para ter acesso aos componentes bioativos oriundos da matéria-prima vegetal utilizam-se métodos de extração. A escolha do método para extrair estes componentes depende da estabilidade térmica e natureza dos compostos a serem analisados. As metodologias tradicionais, como percolação, maceração, Soxhlet, extração sólido-líquido, entre outras, são empregadas para esta finalidade. Essas técnicas têm a vantagem de serem acessíveis na maioria dos laboratórios. No entanto, apresentam desvantagens, como o superaquecimento da matriz, a perda de

bioatividade e a baixa estabilidade do produto. Além disso, fazem uso de solventes orgânicos, o que pode ser um problema para aplicação posterior dos produtos extraídos (DAWIDOWICZ; WIANOWSKA, 2004; SHIRSATH; SONAWANE; GOGATE, 2012).

Por outro lado, as técnicas de extração não-convencionais, como a extração com fluido supercrítico (SFE), extração assistida por micro-ondas (MAE), extração de líquido pressurizado (PLE) e extração assistida por ultrassom (US); tem-se mostrado como abordagens de grandes potenciais, já que visam à máxima recuperação destes compostos aliada à alta estabilidade e baixo custo energético, quando comparados aos métodos de extração convencionais. No que se refere a extração assistida por ultrassom, essa utiliza energia das ondas ultrassônicas que são transmitidas em frequência superior à capacidade auditiva humana (acima de 20 kHz), aumentando as taxas de transferência de massa e possibilitando a ruptura da parede celular devido à formação de microcavidades, levando a maiores rendimentos com tempo e consumo de solventes reduzidos (BARRALES et al., 2018; SHIRSATH; SONAWANE; GOGATE, 2012).

Frente ao exposto, o estudo da obtenção de compostos bioativos do resíduo da vinicultura é de grande relevância para consolidação do uso integral do bagaço da uva. Compreendendo o potencial da matéria-prima, a presente proposta visa analisar a extração de compostos fenólicos por meio a técnica de ultrassom, caracterizando os extratos quanto à atividade antioxidante e compostos fenólicos totais, bem como identificar o perfil fenólico obtido.

Uma vez obtido os compostos fenólicos, os mesmos podem ser utilizados em diversas aplicações, com enfoque para a área da saúde, devido às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas. No entanto, é importante que esses compostos sejam testados inicialmente em células saudáveis, o que permite avaliar a toxicidade e a segurança desses compostos (CHOUDHARI et al., 2020). Nesse contexto, a presente proposta, além de realizar a extração de compostos fenólicos, visa avaliar *in vitro* o efeito do extrato obtido na viabilidade celular e no estresse oxidativo de células mononucleares do sangue periférico humano (CMSPs).

1.1 JUSTIFICATIVA

De acordo com o a OIV (2022), a região sul corresponde a mais de 90% da produção de vinhos no Brasil. Sendo assim, juntamente com a produção, a geração de resíduos dessa indústria estão localizadas, majoritariamente, na região Sul do país. Com o crescimento da produção e processamento de uva, o volume de bagaço também aumenta, o que torna crucial a implementação de soluções tecnológicas para o aproveitamento desse resíduo agroindustrial na geração de produtos de maior valor agregado. Dessa forma, o presente estudo justifica-se pelo aperfeiçoamento de tecnologias para aproveitamento e agregação de valor ao resíduo da vinicultura.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Realizar a extração de compostos fenólicos do resíduo da produção de vinho por meio da técnica de extração por ultrassom.

1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as condições de tempo de processo por meio de uma cinética de extração;
- Avaliar a influência das variáveis de processo: temperatura, razão sólido/líquido, potência de ultrassom e concentração de solvente na obtenção de compostos fenólicos e determinar a melhor condição experimental;
- Determinar a composição dos compostos fenólicos totais nas diferentes condições experimentais avaliadas;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos obtidos nas diferentes condições experimentais avaliadas;
- Determinar o perfil fenólico obtido através do resíduo da produção de vinho;
- Comparar a extração por ultrassom com um método de extração convencional;
- Analisar o extrato quanto a viabilidade celular e estresse oxidativo de células do sangue periférico humano.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 VINICULTURA

2.1.1 Produção de vinho no Brasil

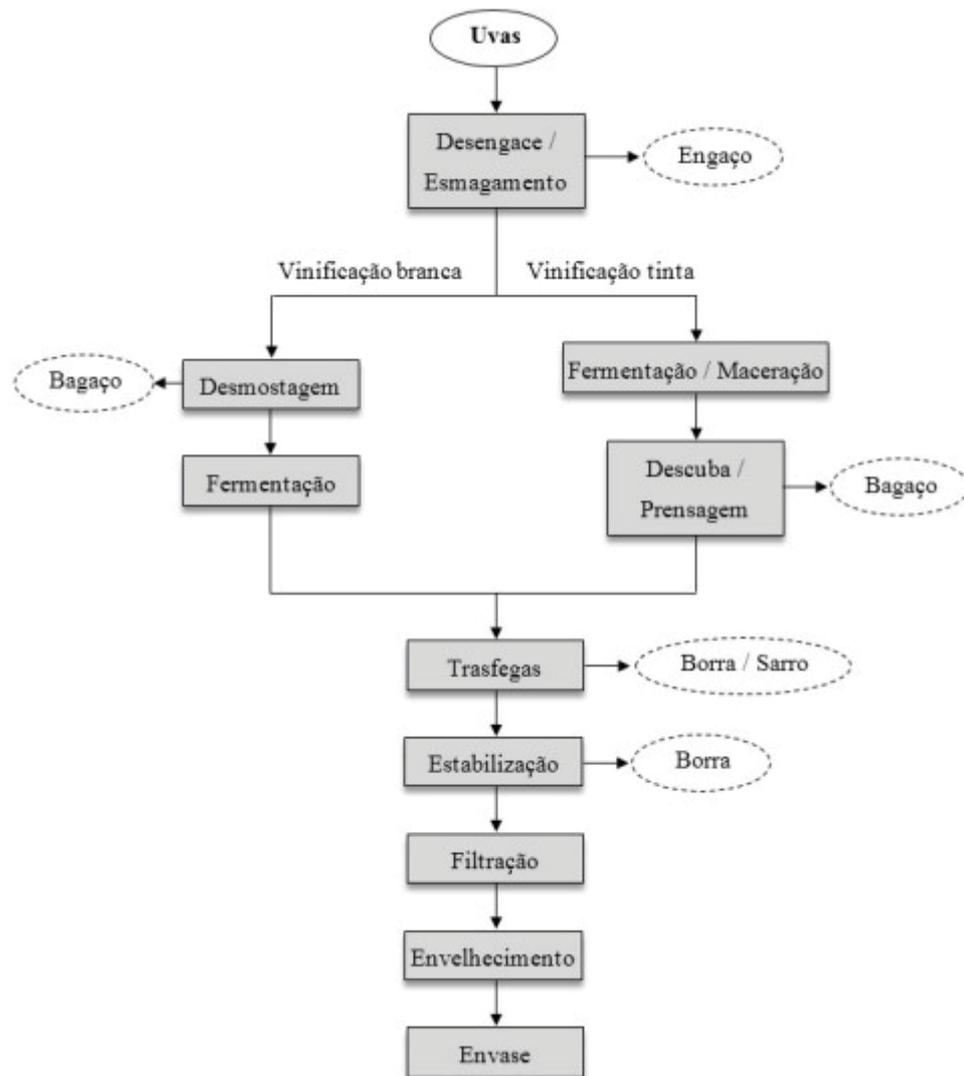
Sendo cultivada nos cinco continentes e em mais de 100 países, a uva é a quarta fruta mais produzida no mundo, a fruta foi introduzida no Brasil pelos portugueses durante o século XVI. Contudo a produção de vinhos teve início somente com a chegada dos imigrantes italianos, a partir de 1870, principalmente na região sul e sudeste do país (AMARANTE, 1986). A vitivinicultura foi difundida também para a região nordeste, no vale do rio São Francisco, a partir da qual o Brasil tem aumentado sua relevância no mercado dos vinhos finos, com aumento de produção e safras premiadas mundialmente (OIV, 2022).

Segundo a Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV, 2022), entre 2020 e 2021 o Brasil registrou uma produção de 3,6 milhões de hectolitros de vinho, o maior volume registrado no país desde 2008, o que colocou o país como o 14º no ranking dos maiores produtores do mundo. No que se refere ao consumo de vinho em 2021 o Brasil apresentou um aumento de 1,2% em relação ao ano de 2020, registrando um consumo de 4,1 milhões de hectolitros. O aumento registrado reflete uma mudança de consumo observada nos últimos anos, durante a pandemia da Covid-19, que fez com que os consumidores apresentem maior interesse pela bebida, colocando o vinho como a “bebida da quarentena”. Associado a alta da demanda, as boas condições climáticas e a expansão das áreas de vinhedos, tem-se uma expectativa de melhor desempenho para a safra 2021/2022 (OIV, 2022).

2.1.2 Processos de produção de vinho

Na Figura 1 está representado um esquema simplificado dos processos mais utilizados na produção de vinho tinto e branco. Observa-se que a diferença, entre esses, é apenas na etapa de fermentação, em que para o vinho tinto, as cascas e sementes da uva são fermentadas juntamente com o mosto, enquanto que para o vinho branco estes materiais são separados logo após o esmagamento das uvas.

Figura 1- PROCESSOS DE VINIFICAÇÃO NO BRASIL



FONTE: EMBRAPA, 2018.

De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2018), o processo tem início com a etapa de desengace e esmagamento das uvas. No desengace é realizado a retirada do engaço, componente rico em taninos, o qual pode conferir adstringência e amargor indesejáveis aos vinhos. O esmagamento é realizado para liberar o suco da fruta e esse não deve permitir que as partes sólidas da uva (casca e sementes) sejam trituradas, uma vez que, causaria a formação de borras e aparecimento de sabor herbáceo.

Para dar continuidade à produção do vinho branco, após o esmagamento é realizada a desmostagem, que consiste na separação do mosto das partes sólidas da uva, gerando nessa etapa o resíduo do bagaço de uva não fermentado, composto por

cascas, sementes e eventuais engaços remanescentes. Para o vinho tinto, o mosto é fermentado juntamente com as partes sólidas da uva, cujos pigmentos irão conferir a cor característica deste vinho. Em seguida, ocorre a etapa de fermentação, na qual leveduras são adicionadas ao mosto e transformam açúcares em etanol e subprodutos. No caso do vinho tinto, juntamente com a fermentação ocorre a maceração, etapa em que ocorre a extração dos compostos presentes nas partes sólidas da uva. Ainda para o vinho tinto, após a fermentação ocorre a etapa de descuba, que consiste na separação das partes sólidas do vinho em produção, gerando como resíduo o bagaço de uva fermentado. Esse bagaço é prensado para aumentar o rendimento de vinho obtido, no caso do processamento do vinho branco, a prensagem pode ser realizada no início da vinificação.

Seguidamente é realizada a etapa de trasfega, onde o vinho é transferido de um recipiente para outro, objetivando remover os sólidos insolúveis remanescentes. Nesta etapa, dois outros resíduos são gerados: a borra, massa heterogênea composta basicamente de vinho e sólidos insolúveis como sais de tartarato, e, em menor quantidade, o sarro, material sólido mais resistente que permanece incrustado nos recipientes.

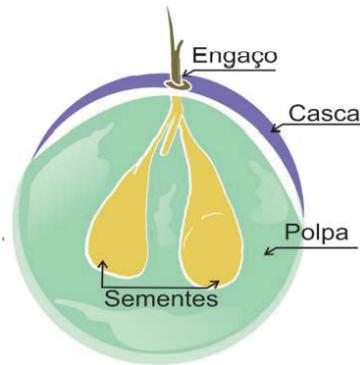
Posteriormente a trasfega é feita a estabilização do vinho, etapa na qual substâncias como polifenóis, proteínas e ácido tartárico são neutralizados ou removidos por sedimentação. A estabilização dos fenólicos é realizada adicionando-se compostos proteicos que se complexam com os polifenóis, dessa forma sedimentando e reduzindo a turbidez e adstringência do vinho. Nessa etapa, também ocorre a geração de uma borra como resíduo. A filtração é uma das últimas etapas na produção dos vinhos, na qual ocorre a retirada de micropartículas indesejáveis e a estabilização microbiológica. Após filtrado o vinho passa por um processo de envelhecimento e segue para consumo.

2.1.3 Resíduos da produção de vinho

O principal resíduo gerado durante a produção de vinhos é o bagaço da uva. A quantidade de resíduo gerado durante o processo depende de vários fatores, relacionados principalmente pelo tipo de processamento adotado pela vinícola. De maneira geral, relaciona-se a quantidade de resíduo gerado com a quantidade de uva processada. González-Centeno et al. (2010) consideram que o bagaço representa

cerca de 10 a 20% do peso da uva processada; já Teixeira (2014) e Beres et al. (2017) identificaram na literatura valores de 20 a 30% em relação ao peso inicial de uva. Esse resíduo é constituído basicamente da polpa residual, de cascas, sementes e engaços, conforme demonstrado na Figura 2.

Figura 2- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS COMPONENTES DO RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE VINHO



FONTE: EMBRAPA, 2018.

A proporção de cada componente do bagaço é variada e depende de diversos fatores: variedade da uva, o solo, o clima e a safra, o que proporciona grande variabilidade na constituição desse resíduo. Em geral, o bagaço seco é composto por 5 - 10% de polpa residual, 38 - 52% de sementes e 8 - 20% de casca e engaço (BERES et al., 2017). Os resíduos oriundos do processo de vinificação branca apresentam em sua composição maior quantidade de polpa residual e açúcares quando comparados aos de vinificação tinta, devido a diferença do processo de produção.

Assim como a proporção dos componentes do resíduo é variável, a composição desse material também varia e depende dos mesmos fatores supracitados, sendo compostos basicamente de água (umidade), fibras, proteínas, lipídios (óleos), carboidratos metabolizáveis (açúcares e amido), minerais (cinzas) e metabólitos secundários (compostos bioativos) (BERES et al., 2017). Dessa forma, esses resíduos são fontes para o aproveitamento e desenvolvimento de coprodutos de valor agregado para o uso em diferentes segmentos industriais.

2.1.4 Utilização do resíduo da produção de vinho

A utilização direta do bagaço de uva inclui a destilação, alimentação animal e propagação da terra de maneira controlada. Contudo, o bagaço de uva ainda é tratado como um produto de baixo valor econômico e estima-se que somente 3% do resíduo da indústria vinícola passa por um processo de aproveitamento (ILYAS et al., 2021).

A partir do aproveitamento integral de resíduos da indústria de vinho, podem ser produzidos insumos de alto valor agregado para os ramos alimentício, farmacêutico e cosmético. O aproveitamento integral possibilita a diversificação da oferta de produtos, diminuição do volume de resíduos, aumento da oferta de alimentos, diminuição do desperdício de matéria-prima e energia, além de agregar valor ao processo industrial (VALENTE, 2015). Além disso, com a crescente demanda dos consumidores por compostos naturais/orgânicos ao invés dos compostos sintéticos, já existem diversas aplicações para o bagaço de uva (BERES et al., 2017). Nesse contexto, a seguir serão apresentadas as principais aplicações para o aproveitamento integral do bagaço de uva.

2.1.4.1 Farinha da casca de uva

O ingrediente mais comercial obtido a partir do bagaço de uva é a farinha da casca. O processo consiste basicamente em secar e moer a casca da uva. Esse produto apresenta alto teor de compostos fenólicos e fibras alimentares. Não há necessidade de extração para sua utilização e, assim, o processo de obtenção desse produto é mais econômico e tem menor impacto sobre o meio ambiente, resultando em uma abordagem sustentável. Após a secagem, as cascas devem ser moídas para quebrar as partículas maiores e transformá-las em uma farinha homogênea a qual é utilizada na indústria de alimentos. A farinha de uva pode ser comercializada como farinha ou como ingrediente de outros produtos, como pães e biscoitos (EMBRAPA, 2018).

2.1.4.2 Óleo de semente de uva

Na semente de uva são encontrados cerca de 10 a 20% de lipídios, dependendo da variedade da uva. O óleo proveniente da semente de uva é

considerado um coproduto de alto valor agregado e é utilizado principalmente nas indústrias cosmética e alimentícia. Este óleo contém alto teor de ácidos graxos insaturados, como o ácido linoleico (EMBRAPA, 2018). Apesar de ter alto valor no mercado, o óleo raramente é recuperado, provavelmente devido às dificuldades de separar as sementes das demais frações do bagaço (JIN et al., 2021).

2.1.4.3 Fibras alimentares da casca e da semente

A recuperação de fibras com destino à alimentação humana pode compreender processos para obtenção de fibras solúveis e/ou insolúveis. As fibras provenientes da semente, bem como as provenientes da casca, apresentam potencial de aplicação diversificado, incluindo a incorporação em produtos cárneos, na panificação, em produtos lácteos e à base de frutas. Essas fibras também apresentam grande potencial para aplicação no mercado de suplementos alimentares, uma vez que são consideradas como fibras nobres, principalmente as arabinogalactanas (cascas) e as galactomananas (sementes) (LAVELLI et al., 2016).

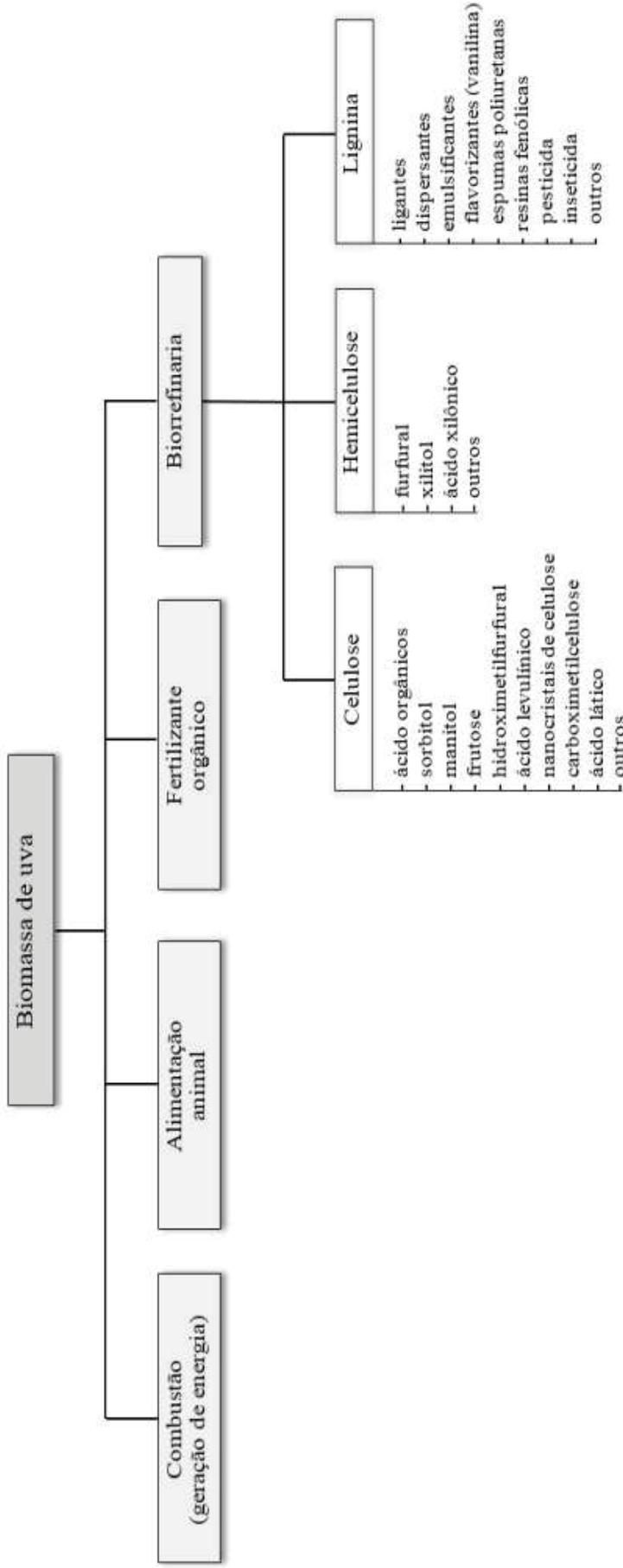
2.1.4.4 Compostos bioativos das cascas e sementes

O bagaço da uva proveniente do processo de produção de vinho apresenta conteúdo elevado de compostos fenólicos biologicamente ativos, uma vez que as práticas de vinificação extraem apenas parte desses compostos. Estima-se que aproximadamente 70% do conteúdo fenólico é preservado no bagaço de uva após o processamento (BERES et al., 2017). Os principais compostos fenólicos presentes no bagaço de uva são: antocianinas, ácidos fenólicos, flavonóis e resveratrol. No caso da vinificação em branco, o teor de compostos fenólicos do bagaço é maior, já que no processo há pouco contato da polpa com a casca (GÓMEZ-PLAZA et al., 2006).

2.1.4.5 Biomassa final do resíduo da produção de vinho

Após os processos de extração de óleo, de compostos bioativos e de fibras solúveis do bagaço da uva, obtém-se uma biomassa final formada por material lignocelulósico composto principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. Esse material pode ainda ter diversas aplicações, como alimento para animais, fertilizante ou combustível, conforme esquema da Figura 3.

Figura 3- PRINCIPAIS APLICAÇÕES DA BIOMASSA FINAL DE UVA



Fonte: Adaptado de (BERES et al., 2017).

Devido à sua abundância em carboidratos, os resíduos representam interessantes fontes renováveis de biomassa lignocelulósica para a produção de biocombustíveis (Hernández et al., 2021). A biomassa final da uva pode ainda ser utilizada como combustível sólido e gasoso. Na queima da biomassa na forma de material particulado, pellets ou briquetes, são gerados gases que, por sua vez, são transformados em energia (BOTELHO, 2016).

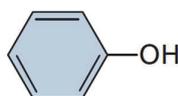
A biomassa também pode ser utilizada como complemento alimentar para animais e como fertilizante agrícola e, inclusive, o interesse em seu uso está em evidência pelo fato de ser um fertilizante orgânico (ABARGHUEI et al., 2010; FERNANDES et al., 2005).

Ainda visando o aproveitamento da biomassa na geração de produtos de maior valor agregado, tem-se o conceito de biorrefinarias, o qual envolve a obtenção de produtos de elevado valor agregado por meio de rota bioquímica ou termoquímica. A obtenção de bioprodutos é considerada a rota de maior aproveitamento da biomassa da uva. A partir das estruturas presente nesse material (celulose, hemicelulose e lignina) são gerados novos compostos de alto interesse industrial e alto valor agregado (EMBRAPA, 2018).

2.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

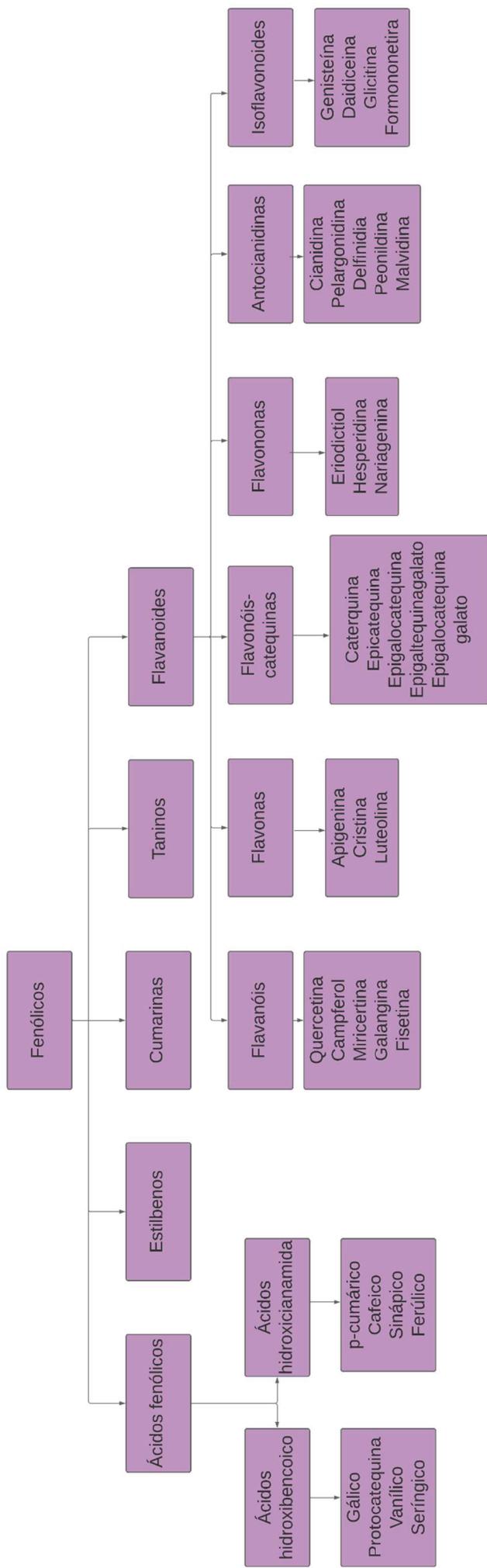
Os compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados abundantemente no reino vegetal. Consistem em um grupo hidroxila ligado diretamente a um grupo hidrocarboneto aromático, sua estrutura básica está representada na Figura 4. O mais simples é a classe de fenol, que também é chamado ácido carbólico. A quantidade de polifenóis naturais é enorme, estimada em mais de um milhão, pois geralmente ocorrem como glicosídeos, e tais açúcares com suas ligações apresentam grande variedade (SAKAKIBARA et al., 2003). As principais classes e subclasses de compostos fenólicos podem ser observadas na Figura 5.

Figura 4- FÓRMULA ESTRUTURAL BÁSICA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS



FONTE: (TAIZ et al., 2017).

Figura 5- CLASSIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS.



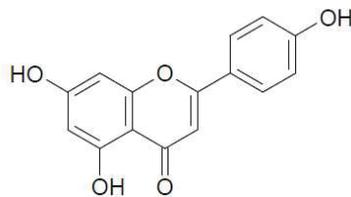
Fonte: Adaptado de LIU (2004).

2.2.1 Flavonoides

Os flavonoides são a maior classe de fenólicos vegetais, existindo cerca de 4.200 estruturas de flavonoides identificadas. Essa grande diversidade ocorre devido as modificações que tais compostos podem sofrer, tais como: hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, entre outras. Esses fenólicos têm uma importância potencial na medicina, como inibidor de AMPc-fosfodiesterase, e na agricultura, desde que os isoflavonóides e rotenóides sejam considerados como fitoalexinas (TAIZ et al., 2017).

O esqueleto básico de carbono dos flavonoides (Figura 6) contém 15 carbonos organizados em dois anéis aromáticos, conectados por uma ponte de três carbonos.

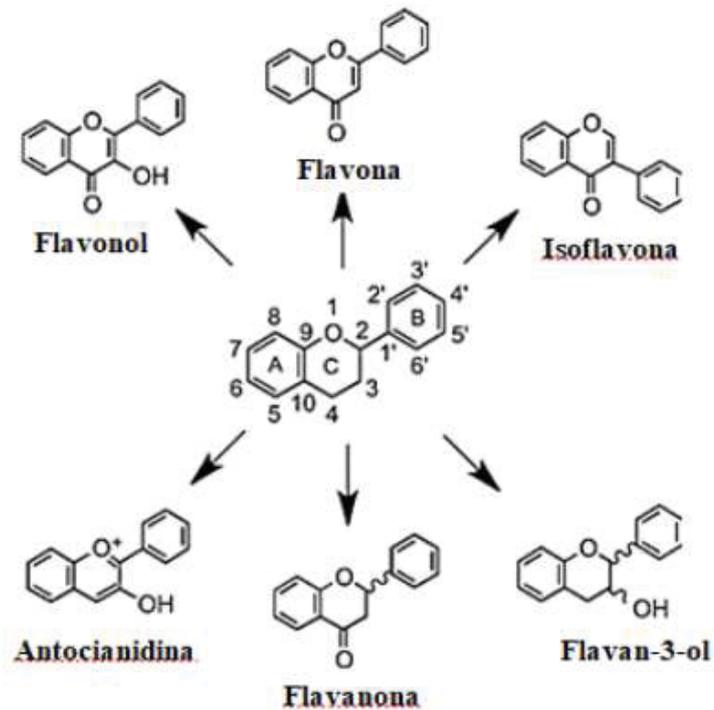
Figura 6- ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONOIDES



FONTE: (TAIZ et al., 2017).

Os flavonoides representam um amplo grupo de derivados fenólicos solúveis em água e coloridos (vermelho, carmesim, púrpura ou amarelo). São os metabólitos secundários mais difundidos no reino vegetal, encontrando-se em maior quantidade nas famílias Leguminosae e Compositae. Apresentam como grande vantagem baixíssima toxicidade, sendo essenciais para a completa absorção de vitamina C. Eles podem ainda proteger as plantas contra os danos causados pela luz ultravioleta. Os flavonoides são divididos em seis grandes grupos: antocianinas, flavonas, isoflavonoides, flavanóis-catequinas, flavononas e flavonóis (TAIZ et al., 2017).

Figura 7- ESTRUTURA QUÍMICA DOS FLAVONOIDES E SEUS DERIVADOS



FONTE: DEL RIO et al., 2013.

2.2.1.1 Flavanóis

Dentro deste grupo complexo, os principais constituintes presentes na uva, são os monômeros catequinas e epicatequinas, e os oligômeros ou polímeros denominados proantocianidinas (PEREIRA, 2014).

O kaempferol (3,5,7-tri-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-cromen-4-ona) está presente em 80% dos alimentos à base de plantas, incluindo brócolis, couve, uva, morango, maçã e chá. Possui efeitos benéficos e/ou efeitos protetores contra várias doenças como o câncer, devido à sua capacidade para induzir apoptose de células cancerosas (KASHYAP et al., 2017).

A quercetina é um antioxidante encontrado em vegetais, abundante na dieta humana. Geralmente é encontrada nos alimentos na forma glicosilada, como glicosídeos de quercetina, que constituem 70% de todos os flavonóis na dieta (WANG et al., 2017). Esse composto apresenta propriedades antioxidantes, antiproliferativas, anti-inflamatórias, antihistamínicas, antivirais, anticarcinogênicas, propriedades protetoras psicoestimuladoras e imunossupressoras (HALEAGRAHARA et al., 2017).

A miricetina é comumente encontrada em vegetais, frutas, nozes, bagas, chás e, no vinho tinto (ZHANG et al., 2017). As catequinas são compostos incolores e hidrossolúveis que contribuem para o amargor e a adstringência do vegetal. São encontradas em chá verde, cerejas, amoras, framboesas, mirtilo, uva roxa e vinho tinto (PEREIRA; CARDOSO, 2012). As catequinas e outros bioflavonóides exibem atividade antioxidante semelhante à das vitaminas C (ascorbato) e E (tocoferol), que também demonstram reduzir o risco de certos tipos de câncer, quando administradas como suplementos ou constituem naturalmente a alimentação (MANFREDIN; MARTINS; BENFATO, 2004).

2.2.1.2 Antocianidinas

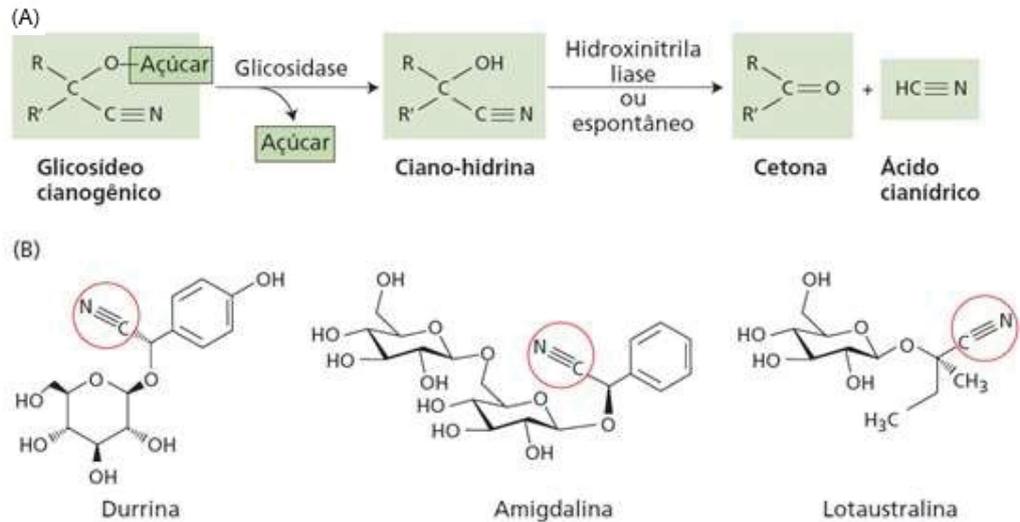
As antocianidinas possuem como função: proteção UV, atração de animais para polinização e dispersão de sementes, defesa contra patógenos e pragas e proteção para o DNA e o aparelho fotossintético dos fluxos de radiação elevados (SZYMANOWSKA et al., 2015).

São também responsáveis por uma variedade de cores como vermelho, azul, roxo e laranja. A casca da uva pode conter até 25 pigmentos distintos, dependendo da variedade. O corante é denominado enocianina, e seu principal cromóforo é a mistura complexa de antocianinas: antocianidina (aglicona), açúcar e frequentemente ácidos. As antocianinas são solúveis em água e em mistura de água e álcool e insolúveis em óleos e gorduras (ARAÚJO, 2004).

2.2.2 Taninos

Os taninos são polímeros fenólicos com propriedades de defesa vegetal, assim como a estrutura da lignina. Há duas categorias de taninos: os condensados e os hidrolisáveis. Os condensados são formados pela polimerização de unidades de flavonoides, comuns em plantas lenhosas; são conhecidos também como pro-antocianidinas, por frequentemente serem hidrolisados a antocianidinas com tratamento à base de ácidos fortes (Figura 8A). Já os hidrolisáveis são polímeros heterogêneos que contém ácidos fenólicos (ácido gálico em especial) e açúcares simples (Figura 8B) (TAIZ et al., 2017).

Figura 8- ESTRUTURA GERAL DE UM TANINO CONDENSADO (A) E UM HIDROLISÁVEL (B).



FONTE: (TAIZ et al., 2017).

2.2.3 Estilbenos

O estilbeno é um composto difícil de ser encontrado, contudo, muitos de seus derivados são extraídos de plantas e apresentam atividades biológicas e terapêuticas importantes. Tais compostos são denominados fitoalexinas, no qual destaca-se o resveratrol, encontrado em alguns tipos de uva (NOBRE et al., 2006). O resveratrol é associado ao “Paradoxo Francês”, o qual descreve a baixa incidência de doenças cardíacas e obesidade entre os franceses, mesmo com dieta rica em gordura e alta ingestão de vinho. O resveratrol é responsável pela redução do estresse oxidativo em vários tipos de doenças (DI DONNA et al., 2017).

2.2.4 Cumarinas

As cumarinas são amplamente distribuídas nos vegetais, são encontradas em fungos e bactérias, sendo identificadas mais de 1.300 cumarinas de fontes verdes, as quais podem estar presente em todas as partes da planta (MESQUITA et al., 2013). Muitas cumarinas possuem atividades imunossupressora, relaxante muscular, hipolipidêmica, hipotensora, vasodilatadora, espasmolítica e antitrombótica, e algumas são também utilizadas na prevenção de doenças causadas por radicais livres (SIMÕES et al., 2017).

2.2.5 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são compostos simples formados por um anel aromático e os substituintes ligados à sua estrutura, podem se apresentarem sob sua forma livre e podem também estar ligados entre si ou com outros compostos (BRAVO, 1998; SOARES, 2002). São divididos em dois grupos. O primeiro é composto pelos ácidos hidroxibenzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C6-C1) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. Incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e siríngico. O segundo grupo é formado pelos ácidos hidroxicinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C6-C3), sendo os mais comumente encontrados no reino vegetal. Incluem os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sinápico. O ácido caféico é um dos ácidos mais abundantes e representa a maior parte de ácidos hidroxicinâmicos totais contidos em muitas frutas, principalmente nas partes mais externas de frutas maduras (ANGELO; JORGE, 2007).

Assim como os demais compostos fenólicos, os ácidos fenólicos apresentam atividade antioxidante, a qual depende do número e posição de grupos hidroxila em relação ao grupo funcional carboxila. A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos aumenta com o aumento do grau de hidroxilação, como é o caso do trihidroxilado ácido gálico, que apresenta alta atividade antioxidante. Em contrapartida, a substituição dos grupos hidroxila nas posições 3 e 5 por grupos metoxila, como no caso do ácido siríngico, reduz a atividade antioxidante. Ácidos monohidroxibenzóicos com o grupo OH ligado nas posições orto ou para em relação ao grupo COOH não apresentam atividade antioxidante, porém, isso não acontece para o ácido m-hidroxibenzóico. Os ácidos hidroxicinâmicos apresentam maior atividade antioxidante que os ácidos hidroxibenzóicos correspondentes. Isso pode ser devido ao grupo $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$, que garante maior habilidade de doar íons H^+ e estabilizar radicais que o grupo COOH (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006).

2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NA UVA

Dentre as frutas e vegetais as uvas são consideradas uma das maiores fontes de compostos fenólicos. O conteúdo do perfil fenólico das uvas é diversificado, variando entre as cultivares, o que resulta em uvas com diferentes características, tanto de sabor quanto de coloração (ABE et al., 2007).

Os compostos fenólicos estão distribuídos de maneira diferente quanto a sua presença/ausência e pequena/grande quantidade nas partes do fruto. Na casca é possível encontrar todos eles; na polpa são encontrados flavanóis e ácidos fenólicos e nas sementes somente flavanóis (CABRITA et al., 2003).

Em uvas tintas, as antocianinas constituem a maior porcentagem de compostos fenólicos. As antocianinas (cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina) são flavanoides amplamente distribuídos na natureza e são responsáveis pela maioria das cores azul e violeta e todas as tonalidades de vermelho presentes em flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes. Nas uvas elas podem estar presentes na casca e na polpa, no caso das uvas tintureiras, ou apenas na casca e nas 3 ou 4 primeiras camadas da hipoderme nas uvas tintas (CABRITA et al., 2003).

Os flavanóis (catequina, epicatequina e epigalocatequina), estão presentes basicamente nas sementes das uvas e são os principais compostos fenólicos responsáveis pelo sabor e adstringência de vinhos e sucos de uva. Dentre os flavanóis, destacam-se os 3-flavanóis e as proantocianidinas. A (+)-catequina e a (-)-epicatequina são os 3-flavanóis mais encontrados, sendo o primeiro mais representativo e o principal flavonóide em uvas brancas. As proantocianidinas são dímeros, trímeros, oligômeros ou polímeros de 3-flavanóis, sendo que as encontradas em maior quantidade em uvas e vinhos são constituídas por (+)-catequina e (-)-epicatequina e denominadas procianidinas (CABRITA et al., 2003).

Os flavonóis (quercetina, caemferol e miricetina) estão presentes em menor quantidade e somente na casca, na forma de glicosídeos, contudo possuem importante papel na coloração do vinho, uma vez que, atuam como co-pigmentos junto às antocianinas. Os ácidos fenólicos, hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos, usualmente encontrados em baixas concentrações, representam um dos principais compostos em uvas brancas, influenciando o aroma e gosto dos vinhos (ABE et al., 2007).

2.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

2.4.1 Métodos convencionais de extração de compostos fenólicos

Os métodos convencionais de extração de compostos fenólicos baseiam-se na difusão dos compostos de uma matriz sólida (alimento) utilizando uma matriz

líquida (solvente). A eficiência da extração depende principalmente da escolha do solvente, tendo-se a polaridade do composto alvo como fator importante na escolha. Outros aspectos a serem considerados são: afinidade molecular entre solvente e soluto, transferência de massa, utilização de cossolvente, segurança ambiental, toxicidade para humanos e viabilidade financeira (COWAN, 1999).

Os solventes mais utilizados para extração de substâncias fenólicas são o metanol e misturas de metanol/água, a adição de água ao solvente contribui para criar um meio moderadamente polar, favorecendo a extração de polifenóis. Outros solventes tais como acetona, acetato de etila e misturas de solventes também têm sido utilizados, mas geralmente promovem baixo rendimento (TSAO, 2010; NOUR et al., 2014).

Xu e Chang (2007) apontam outros fatores, além da natureza do solvente, que contribuem para a eficiência da extração dos métodos convencionais, sendo eles:

a) Temperatura de extração: elevadas temperaturas são necessárias para aumentar a eficiência da extração desde que o calor torne as paredes celulares permeáveis, aumente os coeficientes de solubilidade e a difusão dos compostos a serem extraídos e diminua a viscosidade dos solventes, contudo temperaturas extremas podem degradar os compostos fenólicos;

b) Número de etapas da extração e volume de solvente: a eficiência da extração aumenta de acordo com o número de etapas da extração e são necessárias 3 a 5 extrações sequenciais da amostra original para obter rendimentos quantitativos;

c) Tempo de extração: curtos períodos de extração podem não ser suficientes para a completa transferência dos solutos para a fase orgânica, no entanto, longos tempos de extração em elevadas temperaturas podem oxidar os compostos fenólicos da amostra;

d) Tamanho das partículas das amostras: de maneira geral a taxa de extração aumenta com diminuição do tamanho de partícula da matriz sólida, visto que ocorre um aumento da área disponível para a transferência de massa;

e) Proporção amostra-solvente: quanto menor a proporção amostra-solvente, maior a transferência de massa que ocorre entre a amostra e o solvente;

f) Força iônica: o aumento da força iônica da fase aquosa acarreta a diminuição da solubilidade de inúmeros compostos covalentes, o que favorece a solubilização dos compostos na fase orgânica.

A extração convencional é a técnica mais empregada na extração de compostos fenólicos devido principalmente a sua simplicidade e relativo baixo custo (AZMIR et al., 2013). Entretanto, apresenta alguns desafios, como requerimento de solventes de elevado grau de pureza e muitas vezes tóxicos, evaporação de grande quantidade do solvente, baixa seletividade da extração, emprego de temperaturas e tempos elevados. Além disso, também apresenta exposição à luz e ao oxigênio o que possibilita a ocorrência de degradações, comprometendo a qualidade e o rendimento final dos compostos fenólicos. Dessa forma, novas técnicas foram introduzidas para superar as limitações dos métodos de extração convencionais, as quais são denominadas técnicas de extração não convencionais (ASPÉ e FERNÁNDEZ, 2011).

2.4.2 Métodos não convencionais de extração de compostos fenólicos

As técnicas de extração não convencionais são mais sensíveis, seletivas e rápidas. Algumas são consideradas técnicas sustentáveis por serem menos poluidoras do que as técnicas convencionais, além de buscarem a síntese de produtos químicos menos nocivos e mais seguros, utilização de matéria-prima renovável, redução dos derivados, projetos de eficiência energética e redução do tempo de análise (SUN et al., 2012).

As técnicas mais promissoras são: extração assistida por ultrassom, extração assistida por enzimas, extração assistida por micro-ondas, extração assistida por campo elétrico pulsátil, extração por fluido pressurizado e extração por fluido supercrítico (SÃO JOSÉ et al., 2014; MAJD et al., 2014). Como o foco principal do trabalho envolve a extração assistida por ultrassom, maiores detalhes dessa técnica serão apresentados na seção seguinte.

2.4.2.1 Extração assistida por ultrassom

O ultrassom é uma onda sonora que se propaga em um meio pelo processo de compressão e expansão (PIYASENA et al., 2003). Esse processo gera o fenômeno chamado de cavitação, que significa crescimento e colapso de bolhas. O colapso das bolhas pode produzir efeitos mecânicos, químicos e físicos, que resulta na ruptura das membranas biológicas facilitando a liberação dos compostos, além de intensificar a

penetração do solvente no material celular, aumentando a transferência de massa (TIWARI, 2015).

Na extração assistida por ultrassom a amostra macerada é misturada com solventes e colocada no banho ultrassônico, no qual temperatura e o tempo de extração são ajustados (HERRERA e LUQUE DE CASTRO, 2005). Temperatura, pressão, frequência, tempo, tamanho das partículas da amostra e o solvente empregado são fatores controláveis do processo de extração por ultrassom (AZMIR et al., 2013).

Esse processo de extração é considerado uma técnica sustentável de extração porque comparada as técnicas convencionais causa menores impactos ambientais devido ao menor consumo de energia, uma vez que a extração ocorre em menor tempo (COVA et al., 2019). Em seu estudo, Goula et al. (2016) confirmaram as vantagens do processo de extração assistida por ultrassom em termos de tempo necessário e rendimento de extração de polifenóis. Com apenas 10 minutos em etanol aquoso foram necessários para recuperar os polifenóis do bagaço de uva vermelha grega com um maior rendimento em relação a extração convencional que foi 100 vezes mais longa.

Com a adoção desse procedimento é possível evitar uso de solventes orgânicos caros e prejudiciais ao meio ambiente (metanol, acetona, hexano ,clorofórmio) ou soluções ácidas tipicamente usadas nos procedimentos convencionais de extração (CHOWDHARY et al., 2021 , PORTILLA RIVERA et al., 2021). As técnicas não tradicionais de extração podem ainda reduzir a degradação térmica do extrato, preservando suas atividades alvo (COVA et al., 2019).

2.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos apresentam diversas atividades biológicas, sendo a atividade antioxidante a mais citada na literatura. Há um significativo interesse na extração de substâncias antioxidantes, principalmente a partir de produtos naturais, uma vez que os antioxidantes podem ser de grande benefício dado que eles têm a capacidade de proteger um organismo dos danos causados pelos radicais livres. Dessa forma, sendo capazes de prevenir ou adiar o início de doenças, como cardiovasculares, crônicas (câncer, aterosclerose, artrite reumática, hipertrofia

muscular) e neurodegenerativas, como o Mal de Alzheimer (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013).

No que se refere a capacidade antioxidante existem dois tipos de mecanismos de reação que acontecem, ambos resultando de neutralização ou redução de um radical. Um desses mecanismos se baseia na transferência de elétrons (TE) e o outro na transferência de um átomo de hidrogênio (TAH) (GÜLÇİN, 2012). Os compostos fenólicos agem como antioxidantes devido sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, bem como por causa de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de ácidos graxos e de óleos (CUVELIER et al., 1992).

Além de possuir função antioxidante, os compostos fenólicos também apresentam outras atividades biológicas, como antimicrobiana, anti-inflamatórias e anticâncer. Doshi et al. (2015), descrevem que os bagaços das uvas *Pusa Navarang* e *Merlot* não apenas apresentam propriedades antioxidantes, mas também apresentam imenso potencial como secretagogos de insulina, podendo ser úteis no tratamento do diabetes tipo II.

Por meio de sinergismos com produtos naturais, como os compostos fenólicos, é possível potencializar e recuperar os antibióticos contra as bactérias multirresistentes (AVERILLA et al., 2019). No trabalho de Silva et al. (2018), os polifenóis (antocianinas e taninos) extraídos do bagaço de uvas vermelhas apresentaram inibição contra bactérias Gram-positivas (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermis*) e contra bactérias Gram-negativas como a *Klebsiella pneumoniae*.

As interações sinérgicas entre antibióticos e extrato de bagaço de uva potencializou os efeitos de diversas classes de antibióticos contra *S. aureus* e *Escherichia coli*. Esse efeito está relacionado à elevada concentração de compostos fenólicos encontradas no bagaço de uva da variedade *Cabernet Sauvignon* como ácido gálico, quercetina, kaempferol, ácido siríngico, e ácido p-cumárico (SANHUEZA et al., 2017).

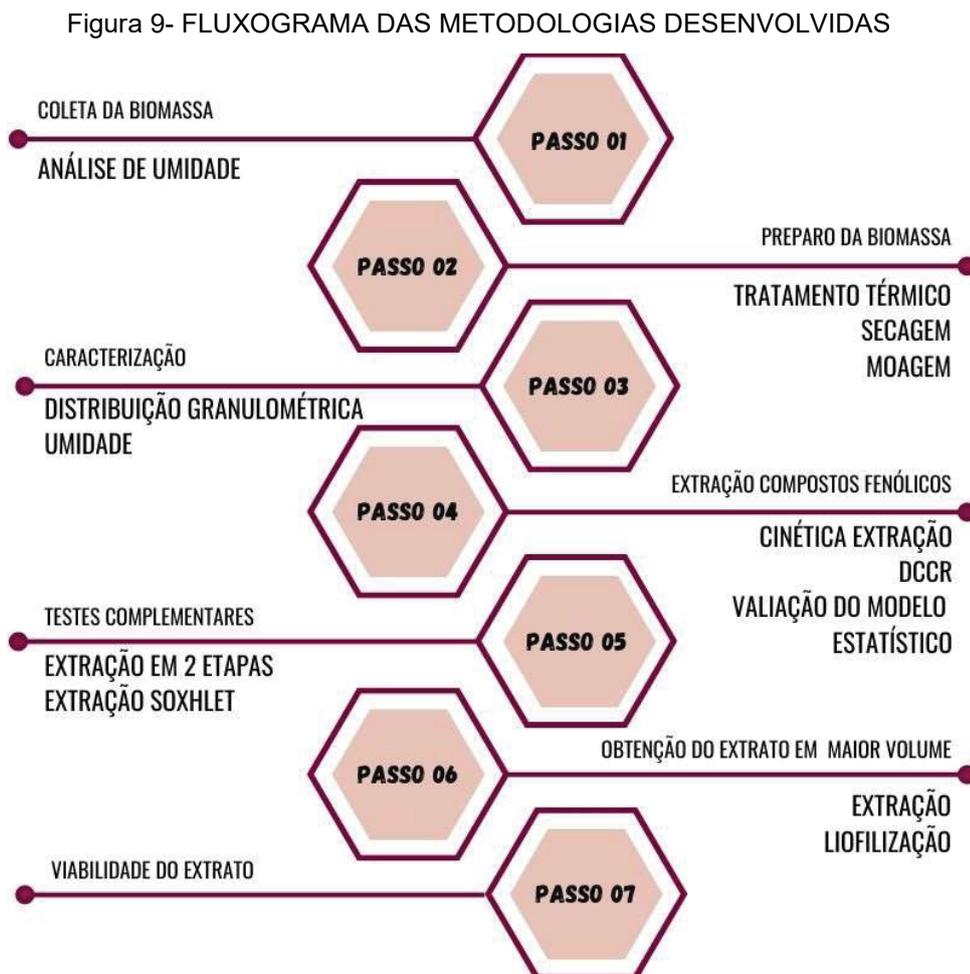
Paulino et al. (2016), relatam que os extratos do bagaço de uva *Tannat*, *Carbernet-Sauvignon*, *Merlot* e *Arinarnoa* apresentaram efeito anti-inflamatório in vitro contra a COX-1 e COX-2. A partir dos bagaços das uvas *Cabernet Sauvignon*, *Cabernet Frank* e *Merlot*, Bucić-kojić et al. (2020), realizaram um tratamento com o fungo *Trametes versicolor* e avaliaram o perfil fenólico e o potencial anti-inflamatórios

dos extratos de bagaço de uva. O potencial anti-inflamatório dos extratos de bagaço de uva foi estudado por meio de testes baseados na inibição da 5-lipoxigenase e da hialuronidase, duas enzimas chave nos processos inflamatórios. Ao longo do tratamento os autores identificaram 24 compostos fenólicos, verificando que o aumento do teor de fenólicos foi acompanhado por um aumento da atividade anti-inflamatória dos extratos de bagaço de uva, o que foi confirmado pela forte correlação entre eles.

Os derivados do bagaço de uva ricos em polifenóis podem ser utilizados na prevenção e terapia do câncer de pele devido ao efeito contra a invasão do câncer e metástase (CHOJNACKA; LEWANDOWSKA, 2018). O bagaço de uva *Vitis vinifera L.* demonstrou atividade de supressão e bloqueio contra o câncer colorretal in vitro (células HT-29) e ações anti-proliferativas e anti-genotóxicas devidas aos ácidos hidroxibenzóico e ácidos hidroxicinâmicos (DEL PINO-GARCÍA et al., 2017). Manca et al. (2015), demonstram que ao incorporar o extrato de bagaço de uva *Cannonau* em vesículas fosfolipídicas inovadoras, atenuou-se significativamente os danos à pele, através da regulação do estresse oxidativo em queratinócitos e fibroblastos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A seguir serão apresentadas as metodologias propostas para o desenvolvimento desta pesquisa visando a obtenção do extrato do resíduo da produção de vinho tinto, a qual contempla as etapas iniciais de preparo da matéria-prima: secagem, moagem, análise de umidade e granulometria. Em seguida, os testes de extração realizados e os métodos analíticos utilizados para caracterizar o extrato obtido: compostos fenólicos totais (CFT), atividade antioxidante total (AAT) e perfil fenólico. A Figura 9 apresenta o fluxograma das metodologias a serem desenvolvidas. Os experimentos e procedimentos analíticos foram realizados nos Laboratórios da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) - *Campus* Chapecó.



FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Matéria-prima para extração dos compostos fenólicos

O bagaço de uva proveniente da produção de vinho tinto foi fornecido pela vinícola Cantina do Tônico, localizada no município de Palmitos - SC. O material foi coletado no dia 25 de janeiro de 2022. Conforme pode ser observado na Figura 10, o material é composto de cascas, sementes, engasgos e suco remanescente. De acordo com o proprietário da vinícola, as uvas bordô utilizadas na produção (*Vitis labrusca*) apresentavam-se murchas, o que dificultou o processo de esmagamento, dessa forma, no resíduo coletado ainda pode ser encontrado grãos inteiros de uva. Além disso, ainda de acordo com o proprietário, para realizar o processo de moagem da uva bordo foi necessário adicionar uma quantidade não especificada da variedade rosa (*Medinilla magnifica*) para dar vazão ao processo de esmagamento.

Figura 10- BIOMASSA COLETADA



Fonte: Acervo do autor, 2023.

3.1.2 Reagentes

Os reagentes utilizados nas etapas de extração de compostos fenólicos e caracterização dos extratos obtidos foram:

- Metanol (Tedia®, grau HPLC);
- Álcool etílico P.A (Neon, 95%);
- Ácido gálico (Êxodo Científica, 99%);
- Folin-Ciocalteau (Êxodo Científica, 99%);
- Carbonato de sódio (Dinâmica; 99%);
- Trolox ácido ()-6-hidroxi-2,5,6,7,9-tetrametilcromano-2-carboxílico (Sigma-Aldrich, 97%);
- DPPH -2,2-difenil-1-picrilhidrazil (Alfa Aesar, 95%);
- Acetato de sódio trihidratado (PM = 136,08);
- Ácido acético glacial P.A.;
- Ácido clorídrico P.A. (PM = 36,5; d = 1,19);
- Cloreto férrico hexahidratado (PM = 270,3);
- Sulfato ferroso heptahidratado (PM = 278,02);
- TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) (PM = 312,34);
- Ácido fórmico.

3.1.3 Equipamentos

Os equipamentos utilizados nas etapas de caracterização da matéria-prima, extração de compostos fenólicos e caracterização dos extratos obtidos foram:

- Estufa de secagem e esterilização com circulação e renovação de ar (American Lab, AL-102/480);
- Moinho de facas tipo Willye (Fortinox, Star FT-50);
- Peneirador eletromagnético (Contenco);
- Balança (Shimadzu, AUX 320);
- Banho termostático (Nova);
- Banho Ultrassônico (Eco-Sonics);
- Centrífuga (Sigma, 3-15KL);
- Liofilizador (Solab, SL 404);

- Evaporador rotativo (Technal, TE 211);
- Espectrofotômetro (Shanghai Metash Instruments, UV-5300PC U);
- Leitor de microplacas (Thermo Scientific, Multiskan FC).

Para a determinação do perfil fenólico dos extratos obtidos foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Cromatógrafo (Shimadzu HPLC-MS 2020);
- Coluna Shim-pack GISS.

3.1.4 Padrões cromatográficos

Para identificação do perfil fenólico foram utilizados como padrões cromatográficos os seguintes compostos:

- Quercetina (Sigma-Aldrich, 99%);
- Miricetina (Sigma-Aldrich, 99%);
- Kaempferol (Sigma-Aldrich, 99%);
- Ácido cafeíco (Sigma-Aldrich, 99%);
- Epicatequina (Sigma-Aldrich, 99%);
- Flavona (Sigma-Aldrich, 99%);
- Ácido P-cumarico (Sigma-Aldrich, 99%);
- Ácido siríngico (Sigma-Aldrich, 99%);
- Pirocatecol (Sigma-Aldrich, 99%);
- Ácido gálico (Sigma-Aldrich, 99%);
- Epigallocatequina (Sigma-Aldrich, 99%).

3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 Preparo da biomassa para extração de compostos fenólicos

Após a coleta, as amostras foram imediatamente encaminhadas ao laboratório da Universidade Federal da Fronteira Sul - *Campus* Chapecó, onde foram submetidas a pasteurização para inativação enzimática. Esse processo deu-se em banho maria por um período de 15 min, o qual foi contabilizado a partir do momento

que as amostras atingiram a temperatura de 70°C (VALDERRAMA, MARANFONI e CLEMENTE, 2001; TROIANI, TROPIANI e CLEMENTE, 2003). Posteriormente, o material foi seco em estufa de ar circulante, a temperatura de 50°C por 72 horas. Durante esse processo, o material foi constantemente revolvido para garantir uma secagem homogênea.

Após a secagem percebeu-se que a maior parte das sementes da uva separaram-se do restante do material, como pode ser visualizado na Figura 11. Uma vez que o óleo da semente de uva é o coproduto mais valorizado, tendo sua produção bem definida (EMBRAPA, 2018); optou-se por separar a maior parte das sementes e trabalhar com o restante do material (casca, engasgos, polpa e algumas sementes).

Figura 11- BIOMASSA APÓS SECAGEM EM ESTUFA.



Fonte: Acervo do autor, 2023.

Com o intuito de reduzir o tamanho da biomassa, após a secagem o material foi moído em moinho de facas até partículas inferiores a 0,5 mm, selecionadas através de uma peneira de 20 *mesh*, acoplada ao próprio equipamento.

Ao término do processo de moagem o material foi armazenado, em bolsas hermeticamente fechadas, envolvidas com papel laminado para proteger da luz, dentro do freezer.

3.2.2 Caracterização da biomassa

3.2.2.1 Determinação da distribuição do tamanho das partículas

Para a determinação da distribuição do tamanho de partículas da biomassa utilizou-se peneiras na série Taylor 9, 16, 30, 60 e 100 *mesh* para a separação do material. O processo foi realizado em um ambiente escuro a fim de preservar os compostos presentes na amostra. Inicialmente pesaram-se as peneiras, que posteriormente foram empilhadas na seguinte ordem, começando na parte inferior: bandeja inferior (fundo), 100, 60, 30, 16 e 9 *mesh*, conforme pode ser visualizado na Figura 12. Em seguida, foi adicionado aproximadamente 80 g do material em análise na parte superior da série de peneiras e estas foram presas em um agitador eletromagnético, sendo agitadas durante 15 min. Ao término do período, pesaram-se as peneiras para determinar a massa retida em cada uma delas.

Figura 12- APARATO PARA A DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS.



Fonte: Acervo do autor, 2023.

Após a constatação dos resultados do ensaio de peneiramento, o maior volume de biomassa apresentou-se retido na peneira de 60 *mesh*. Objetivando-se trabalhar com um material de tamanho homogêneo separou-se a biomassa que ficou retida nas peneiras de 60 e 100 *mesh*, juntamente com o material de fundo, para realizar os demais ensaios.

3.2.2.2 Determinação da umidade da biomassa

A determinação do teor de umidade da biomassa foi realizada em dois momentos. Primeiramente com o material logo após ser coletado, e segundo com a biomassa após a secagem e redução do tamanho das partículas em moinho. O objetivo desta análise foi medir a quantidade de água e outros componentes voláteis à 105°C presentes nas amostras.

Para determinação do teor de umidade seguiu-se o procedimento padrão do NREL "*Determination of Total Solids in Biomass*" (SLUITER et al, 2005). Inicialmente placas de petri foram previamente secas a 105°C em estufa, em seguida foram colocadas em um dessecador para esfriarem até temperatura ambiente, posteriormente realizou-se a pesagem delas em uma balança analítica. Amostras homogeneizadas de aproximadamente 10 g de biomassa foram pesadas nas placas e tiveram suas massas anotadas. Analogamente, levaram-se as amostras para estufa a 105°C onde permaneceram até massa constante. Após, retiraram-se as amostras colocando-as em um dessecador para que esfriassem até temperatura ambiente. Por fim, pesaram-se as placas contendo a biomassa seca. Para todas as amostras os ensaios foram realizados em triplicata, como mostra a Figura 13.

Figura 13- DEMONSTRAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE EM ESTUFA.



Fonte: Acervo do autor, 2023.

Para o cálculo do teor de umidade da biomassa utilizou-se a Equação 1.

$$\% \textit{umidade} = 1 - \frac{(M3 - M1)}{(M2 - M1)} * 100 \quad (\textit{Equação 1})$$

Onde:

M1: Massa da placa de petri vazia, em g.

M2: Massa da placa de petri + amostra úmida, em g.

M3: Massa da placa de petri + amostra seca, em g.

3.2.3 Obtenção do extrato de compostos fenólicos

3.2.3.1 Extração de compostos fenólicos da biomassa

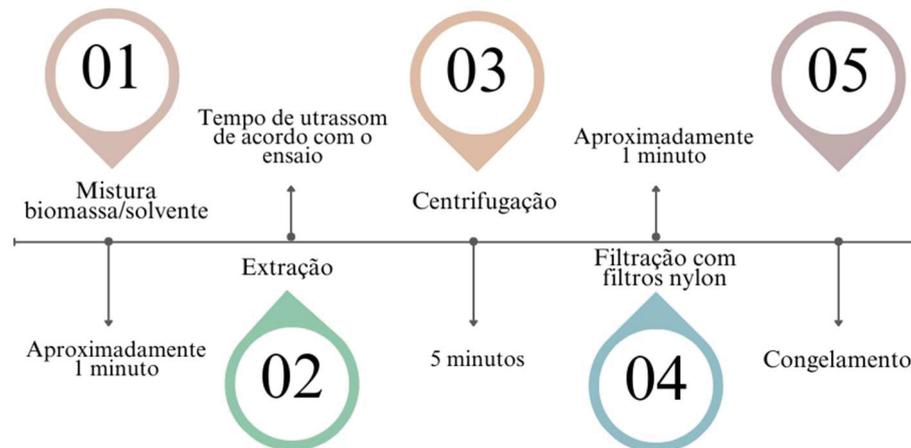
A extração de compostos fenólicos foi realizada utilizando o método de ultrassom, reconhecido por acelerar a interação entre os compostos presentes na biomassa e a solução extrativa, evitando assim a aplicação de altas temperaturas e longos tempos de extração (da Rocha & Noreña, 2020).

Todo o processo de extração deu-se em ambiente escuro com o intuito de preservar os compostos presentes na biomassa. Para realizar a extração a biomassa foi aferida em tubo de ensaio com rosca e em seguida, foi adicionado à solução de extração. Utilizou-se água destilada e etanol 95% como líquidos extratores, visando o aproveitamento da metodologia desenvolvida em preparações de extratos que poderão ser usados em formulações alimentícias, cosméticas e farmacêuticas.

Os tubos foram então condicionados em banho ultrassônico. Decorrido o tempo de extração, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos, na temperatura de 20°C a 5000 rpm. Em seguida, foi desprezado o resíduo e o extrato (sobrenadante) foi filtrado em filtros de nylon (0,45 µm) e armazenado em tubos de Falcon envolto em papel alumínio no freezer (-18 °C) até o momento da realização das análises.

Na Figura 14 estão representadas as etapas do processo de extração, bem como o tempo decorrido para cada etapa.

Figura 14 - TEMPO PARA CADA ETAPA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS



FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

3.2.3.2 Cinética de extração de compostos fenólicos

Experimentos preliminares foram realizados para avaliar a influência do tempo de extração dos compostos de interesse. Para tanto foi realizada uma cinética de extração, com os tempos de 1, 15, 60 e 120 minutos, para a etapa de extração em que as amostras permanecem dentro do ultrassom.

As demais condições de extração foram fixadas em: razão sólido-líquido de 60 g/L, ou seja, 0,6 g de amostra foram submetidas à extração em um volume fixo de 10 mL de uma solução de EtOH:H₂O (50:50, v:v). Os parâmetros, potência de ultrassom e temperatura foram fixados em 100% e 50°C, respectivamente, tendo como diretriz o desenvolvimento de uma tecnologia extrativa rápida e com gasto mínimo de energia e de solvente orgânico.

Em seguida, realizou-se uma segunda cinética de extração com uma razão sólido-líquido de 20 g/L, mantendo-se as demais condições: 10 mL de solução (50% etanol); 100% potência de ultrassom e 50°C. Além disso, também foi aumentado o número de pontos analisados durante a extração para intervalos de 15 minutos, de 0 até 120 min, para a etapa de extração em que as amostras permanecem dentro do ultrassom.

3.2.3.3 Planejamento experimental para analisar as condições do processo de extração

O estudo da otimização para a obtenção do extrato foi realizado com o auxílio de um planejamento de experimentos. A técnica foi empregada objetivando compreender a influência das variáveis estudadas e encontrar a melhor condição de extração do processo. A extração ocorreu conforme metodologia descrita no item 3.2.4.1, fixando o tempo na melhor condição obtida na cinética de extração. Os demais parâmetros de processo seguiram o planejamento experimental.

Foi realizado um DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) utilizando os pontos axiais, a fim de avaliar o efeito quadrático das variáveis investigadas. Este delineamento foi um fatorial completo 2^4 , composto por quatro variáveis, dois níveis, pontos axiais e pontos centrais. Salienta-se que todos os ensaios foram realizados em triplicata e em ordem randômica. Na Tabela 1 podem ser visualizadas as variáveis e os níveis do DCCR.

Tabela 1 - VARIÁVEIS E NÍVEIS DO PLANEJAMENTO DCCR

	Níveis				
	- α	-1	0	1	+ α
Temperatura (°C)	20	35	50	65	80
Razão sólido/líquido (g/L)	4	12	20	28	36
Concentração de etanol (%)	0	20	40	60	80
Potência de ultrassom (%)	20	40	60	80	100

FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

3.2.3.4 Validação do modelo estatístico da extração de compostos fenólicos

Com o objetivo de validar experimentalmente o modelo estatístico obtido a partir do delineamento composto central rotacional, realizou-se uma extração em condições diferentes das análises do planejamento experimental. Para tanto, as condições de extração foram: 65°C, 40% de etanol, 4 g/L e 100% de ultrassom.

3.2.3.5 Testes complementares de extração de compostos fenólicos

A fim de comparar os resultados obtidos pelo planejamento experimental, o qual foi desenvolvido tendo como base o método de extração por ultrassom, realizou-

se outras metodologias de extração. Inicialmente foi realizado uma extração por ultrassom composta por duas etapas de extração e, em seguida, essa extração foi comparada com a extração pelo método Soxhlet. Ambas foram realizadas com uma relação sólido/líquido de 20 g/L.

Para a extração de ultrassom em duas etapas, primeiramente realizou-se uma extração utilizando apenas água destilada como solvente, na temperatura de 20°C e com 20% de potência de ultrassom. Após finalizada a primeira etapa de extração a amostra foi centrifugada, tendo o sobrenadante armazenado para posteriores análises. A matéria-prima residual foi submetida a segunda etapa de extração nas seguintes condições: 65°C, 40% de etanol e 100% de ultrassom.

O mesmo procedimento de extração foi realizado empregando a técnica de Soxhlet, a fim de comparar a mesma com os resultados obtidos em ultrassom para a matéria-prima empregada nesse estudo. Para tanto, 3 gramas de biomassa foram adicionadas em cartuchos extrativos, os quais foram introduzidos nos tubos de extração do Soxhlet. Em seguida, adicionou-se 150 mL (20 g/L) de água destilada em cada balão do extrator juntamente com pérolas de vidro, como ilustrado na Figura 15. Os balões foram colocados no extrator e ligou-se o aquecimento do mesmo para que o processo de sifonações desse início. A extração ocorreu até que o solvente em torno do cartucho se tornou incolor, o que levou pouco mais de 6 horas. Ao final desse ciclo, iniciou-se o segundo ciclo utilizando como solvente uma solução de 150 mL contendo 40% de etanol. A segunda extração ocorreu até que o solvente em torno do cartucho se tornasse incolor, o que levou novamente, pouco mais de 6 horas. Alíquotas de ambos os ciclos foram armazenadas para posteriores análises.

Figura 15- APARATO PARA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS COM A TÉCNICA DE SOHTEX

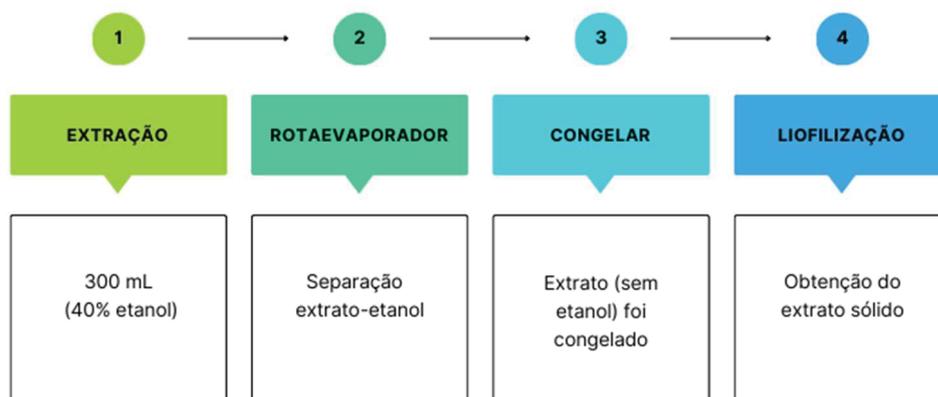


FONTE: Acervo do autor, 2023.

3.2.3.6 Obtenção do extrato em maior volume

Após a definição da melhor condição de extração, realizou-se extrações em maior volume, a fim de obter um volume suficiente para, posteriormente, liofilizar e obter o extrato sólido. O processo para obtenção do extrato sólido está representado na Figura 16.

Figura 16- FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DO EXTRATO SÓLIDO



FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

Inicialmente realizou-se uma extração para obtenção dos compostos fenólicos. A extração ocorreu por um período de 60 min, na melhor condição definida pelo planejamento experimental, em uma solução de 300 mL. Para tanto, utilizou-se um Erlenmeyer de 500 mL acoplado a um condensador, a fim de não se perder a solução extrativa por evaporação, conforme ilustrado na Figura 17.

Figura 17- APARATO PARA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR ULTRASSOM EM MAIOR ESCALA



FONTE: Acervo do autor, 2023.

A fim de possibilitar o congelamento das amostras, o etanol contido no extrato foi evaporado através de um evaporador rotativo. O processo deu-se até que a proporção de etanol adicionada inicialmente fosse recuperada. Em seguida as amostras foram congeladas dentro dos frascos de vidro do liofilizador (SOLAB – SL 404). Após completamente congeladas, as amostras foram submetidas a liofilização até remover completamente sua umidade, conforme Figura 18, o que levou em torno de 48h. As condições de liofilização foram de - 710mmHg e temperatura menor que -25 °C. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em ultra temperatura e protegidas da luz.

Figura 18- EXTRATIVOS LIOFILIZADOS



FONTE: Acervo do autor, 2023.

3.2.4 Determinação dos compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais dos extratos foram determinados pelo método espectrofotométrico pelo reagente de Folin-Ciocalteu, conforme a metodologia descrita por Carniel et al. (2017). Todos os ensaios foram realizados em ambiente escuro a fim de preservar os compostos reativos presentes nos extratos e nos reagentes.

3.2.4.1 Determinação da curva padrão para análise de compostos fenólicos totais

Para a determinação de compostos fenólicos inicialmente foi elaborada uma curva padrão para cada leitura de amostras. Para tanto, preparou-se uma solução estoque de ácido gálico (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a partir da qual foram realizadas diferentes diluições em metanol, a fim de se obter soluções com diferentes concentrações. Os volumes aferidos para cada diluição estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2- CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES DE ÁCIDO GÁLICO PARA CURVA DE CALIBRAÇÃO.

Pontos	[] finais da solução ($\mu\text{g/mL}$)	Volume final (mL)	Volume solução mãe (mL)	Volume de metanol (mL)
1	0	1,5	0	1,5
2	10	1,5	0,03	1,47
3	25	1,5	0,075	1,425
4	50	1,5	0,15	1,35
5	75	1,5	0,225	1,275
6	100	1,5	0,3	1,2
7	125	1,5	0,375	1,125

FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

Coletou-se uma alíquota de 100 μL das amostras para *ependorf*, aos quais foi adicionada alíquotas de 500 μL do reagente de Folin-Ciocalteau (10%, v/v) e 400 μL de carbonato de sódio (7,5% m/v). Os *ependorfs* foram então colocados em banho-maria a 50 °C por 5 minutos, em seguida, foram transferidos para um banho de gelo, por 5 minutos. Posteriormente, a leitura da absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro, no comprimento de onda 760 nm. Para todos os pontos, o ensaio foi realizado em triplicata.

Com os resultados de absorbância foi construído um gráfico de Concentração de Ácido gálico X Absorbância, a partir do qual foi traçada uma linha de tendência. A equação dessa linha foi usada para determinação da concentração dos extratos a partir da absorbância obtida desses.

3.2.4.2 Determinação dos compostos fenólicos totais dos extratos

Para a determinação dos compostos fenólicos totais do extrato obtido, inicialmente as amostras foram diluídas em metanol, de forma de que as absorbâncias de cada amostra correspondam a faixa de absorbâncias obtidas na curva de calibração. A partir da diluição foi coletada uma alíquota de 100 μL das amostras para *ependorf*, aos quais adicionou-se de 500 μL do reagente de Folin-Ciocalteau (10%, v/v) e 400 μL de carbonato de sódio (7,5% m/v). Como controle reacional foi utilizado metanol (100 μL de metanol, 500 μL de Folin-Ciocalteau e 400 μL de carbonato de sódio).

Os *ependorfs* foram colocados em banho-maria a 50 °C por 5 minutos, em seguida, transferidos para um banho de gelo, por 5 minutos. Posteriormente, a leitura

da absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro, no comprimento de onda 760 nm.

A partir da absorbância de cada amostra e da curva de calibração determinada conforme metodologia expressa no item 3.2.5.1, foi calculada a concentração de compostos fenólicos totais do extrato. Para todas as amostras, o ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos como miligrama de ácido gálico equivalente por g de biomassa (mg AGE/g biomassa).

3.2.5 Avaliação da atividade antioxidante total pelo método DPPH

Para determinação da atividade antioxidante total pela metodologia de sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), adaptou-se o procedimento de Roesler et al., (2007). Todos os ensaios foram realizados em ambiente escuro a fim de preservar os compostos reativos presentes nos extratos e nos reagentes.

3.2.5.1 Determinação da curva padrão para análise de antioxidante total pelo método DPPH

Para a determinação da atividade antioxidante inicialmente foi elaborada uma curva padrão para cada leitura de amostras. Para tanto, inicialmente uma solução metanoica de DPPH a 0,004% (m/v (g/mL)) foi preparada, e permaneceu estocada em frascos âmbar a 4 °C até o momento do ensaio. Para a elaboração da curva padrão preparou-se uma solução estoque de Trolox (1.500 µM) a partir da qual foram realizadas diferentes diluições em etanol, a fim de se obter soluções com diferentes concentrações. Os volumes aferidos para cada diluição estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES DE TROLOX PARA CURVA DE CALIBRAÇÃO.

Ponto	Concentração (µmol/L)	Volume (µL) – Solução padrão (mãe)	Volume solvente Etanol (µL)
01	10	10	1490
02	25	25	1475
03	50	50	1450
04	75	75	1425
05	100	100	1400
06	125	125	1375
07	150	150	1350
08	175	175	1325
09	200	200	1300
10	225	225	1275

FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

Posteriormente 40 µL dessas diluições foram transferidas para a placa de leitura, juntamente com 200 µL da solução de DPPH 4%. As amostras permaneceram por 30 minutos em ambiente escuro e decorrido o tempo as leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm.

Para todos os pontos, o ensaio foi realizado em triplicata. A partir dos resultados de absorbância foi construído um gráfico de Concentração de Trolox X Absorbância, a partir do qual traçou-se uma linha de tendência. A equação dessa linha foi usada para determinação da atividade antioxidante dos extratos a partir da absorbância obtida desses.

3.2.5.2 Avaliação da atividade antioxidante total dos extratos

Inicialmente uma solução metanoica de DPPH a 0,004% (m/v (g/mL)) foi preparada, a qual permaneceu estocada em frascos âmbar a 4 °C até o momento do ensaio. Em seguida, diluiu-se as amostras em metanol, de forma de que as absorbâncias de cada amostra correspondam a faixa de absorbâncias obtidas na curva de calibração. Posteriormente 40 µL dessas diluições foram transferidas para a placa de leitura, juntamente com 200 µL da solução de DPPH 4%. Como controle negativo utilizou-se metanol (40 µL de metanol e 200 µL da solução de DPPH 4%) e 240 µL de metanol para corrigir a curva base. As amostras permaneceram por 30

minutos em ambiente escuro e decorrido o tempo as leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm.

A partir da absorbância de cada amostra e da curva de calibração determinada conforme metodologia expressa no item 3.2.6.1, foi calculada a atividade antioxidante do extrato. O percentual do decréscimo na absorbância é medido pela concentração e a capacidade de sequestrar radicais livres é calculado com base no decréscimo da absorbância observada. A capacidade de sequestrar radical livre é expressa como percentual de inibição de oxidação, o qual é calculado utilizando a Equação 2:

$$\% \text{ inibição} = \frac{A_{DPPH} - A_{amostra}}{A_{DPPH}} * 100 \text{ Equação 2}$$

Onde:

A_{DPPH} é a absorbância da solução de DPPH (controle negativo);

$A_{amostra}$ é absorbância da amostra ou padrão em solução.

Para todas as amostras, o ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos como micro mol Trolox Equivalente por grama de biomassa ($\mu\text{mol TE/g}$ biomassa).

3.2.6 Cálculo do índice PA

Uma vez que esse trabalho busca um extrato não apenas rico em compostos fenólicos, mas também com alta atividade antioxidante, avaliou-se os resultados através de um índice que leva em consideração ambos os fatores. Para tanto, calculou-se o índice de Potencial Antioxidante (PA), conforme equação 3.

$$PA = \frac{CFT_i}{CFT_{maior}} + \frac{DPPH_i}{DPPH_{maior}} \text{ Equação 3}$$

Onde:

CFT_i = resultado de CFT para o ponto analisado;

CFT_{maior} = maior resultado encontrado para CTF no ensaio analisado;

AAT_i = resultado de AAT para o ponto analisado;

AAT_{maior} = maior resultado encontrado para AAT no ensaio analisado.

Tratando de uma relação entre o resultado analisado e o maior resultado obtido no experimento, tanto para compostos fenólicos, como para atividade antioxidante, o valor do índice PA deve ser no máximo 2,00. Dessa forma, a partir do índice PA calculado tem-se uma ideia do melhor rendimento tanto em termos de compostos fenólicos, como também, em termos de atividade antioxidante.

3.2.7 Avaliação da atividade antioxidante total pelo método FRAP

Com o intuito de avaliar outras vias de atividade antioxidante do extrato obtido, bem como, possibilitar a comparação com outros resultados da literatura, as melhores condições foram avaliadas quanto a atividade antioxidante pelo método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) – Poder Antioxidante de Redução do Ferro. Para determinação da atividade antioxidante pela metodologia FRAP, foi utilizado o procedimento descrito por Rufino et al., (2006). Todos os ensaios foram realizados em ambiente escuro a fim de preservar os compostos reativos presentes nos extratos e nos reagentes.

3.2.7.1 Determinação da curva padrão para análise de antioxidante total pelo método FRAP

Para a determinação da atividade antioxidante pela metodologia FRAP, inicialmente foi elaborada uma curva padrão para cada leitura de amostras. Para tanto, foi preparado uma solução padrão de sulfato ferroso (2.000 μM), a partir da qual foram realizadas diferentes diluições, conforme Tabela 4.

Tabela 4 - CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES DE SULFATO FERROSO PARA CURVA DE CALIBRAÇÃO.

Ponto	Concentração (μmol)	Volume (μL) – Solução padrão (mãe)	Volume solvente Água (μL)
01	500	250	750
02	1.000	500	500
03	1.500	750	250
04	2.000	1000	0

FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

Também se preparou uma solução do reagente FRAP a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL de uma solução de TPTZ 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM. Essa solução deve ser usada imediatamente após sua preparação, não podendo ser armazenada.

Em seguida transferiu-se uma alíquota de 30 μ L de cada solução de sulfato ferroso para *ependorfs*, juntamente com 90 μ L de água destilada e 900 μ L do reagente FRAP. Após homogeneizados as amostras foram mantidas em banho maria a 37°C durante 30 minutos. Decorrido o tempo necessário as leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm utilizando-se o reagente FRAP como branco para calibrar o espectrofotômetro.

Para todos os pontos, o ensaio foi realizado em triplicata. A partir dos resultados, plotou-se em planilha as concentrações de sulfato ferroso (mM) no eixo X e as respectivas absorbâncias no eixo Y e calculou-se a equação da reta. A partir da equação da reta, calculou-se a absorbância referente a 1000 mM de sulfato ferroso.

3.2.7.2 Avaliação da atividade antioxidante total dos extratos

Inicialmente preparou a solução do reagente FRAP a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL de uma solução de TPTZ 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM. Essa solução deve ser usada imediatamente após sua preparação, não podendo ser armazenada.

A partir do extrato obtido preparou-se três diluições diferentes (v/v), em triplicata (1:5; 1:10 e 1:20). Em seguida, transferiu-se uma alíquota de 30 μ L de cada amostra para *ependorfs*, juntamente com 90 μ L de água destilada e 900 μ L do reagente FRAP, após homogeneizados as amostras foram mantidas em banho maria a 37°C durante 30 minutos. Decorrido o tempo necessário as leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm utilizando-se o reagente FRAP como branco para calibrar o espectrofotômetro. Para todas as amostras, o ensaio foi realizado em triplicata.

A partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos, plotou-se a absorbância no eixo Y e a diluição (mg/L) no eixo X. Em seguida, determinou-se a equação da reta. Para calcular a AAT, foi substituído na equação da reta a absorbância equivalente a 1.000 μ M do padrão sulfato ferroso. O valor obtido para o

termo x (Equação 4) corresponde à diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 µM de sulfato ferroso.

$$y = ax + b \text{ (Equação 4)}$$

Onde,

y = Absorbância correspondente a 1.000 µM de sulfato ferroso

x = Diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 µM de sulfato ferroso

A partir do resultado de (x) encontrado na equação 4, dividir por 1.000 para ter o valor em g. O resultado (Equação 5) é calculado pela divisão de 1.000 (µM) pelo valor de X(g) e multiplicado por 1(g) para encontrar o valor final (Z) que é expresso em µM sulfato ferroso/g de biomassa.

$$X(g) = \frac{x}{1.000} \text{ Equação 5}$$

$$Z = \frac{1.000}{X(g) * 1 g} \text{ Equação 6}$$

3.2.8 Determinação do perfil fenólico por HPLC-MS

O perfil fenólico dos extratos obtido foi determinado utilizando um cromatógrafo líquido Shimadzu acoplado ao detector de massa (HPLC-MS) com fonte de ionização por eletrospray (ESI (-)) seguindo a metodologia descrita por Arruda et al (2018), com adaptações. A coluna utilizada foi a Shim-pack VP-ODS fase reversa (150mm x 2,0 mm (i.d) x 4,6 µm). Como fase móvel A foi utilizado o ácido fórmico 0,3% e como fase móvel B o metanol 50%. Foi utilizado o modo gradiente conforme a Tabela 5, a um fluxo de 0,4 mL/min e a temperatura do forno a 40 °C. A curva padrão foi realizada diluindo os padrões, individualmente, em metanol na concentração de 1.000 ppm. A partir destas soluções foi preparada a mistura dos padrões nas concentrações de 1,5; 3,12; 6,25; e 12,5 ppm. A identificação dos compostos foi avaliada conforme o tempo de retenção dos padrões injetados. A concentração dos compostos foi expressa como mg/L a qual foi posteriormente convertida para mg/g_{biomassa}.

Tabela 5- MODO GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DE B EM FUNÇÃO DO TEMPO EMPREGADO NA DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

Tempo*	Concentração de B em ppm
0,01	5%
1,00	5%
4,00	60%
7,00	70%
10,00	100%
11,5	100%
12,5	5%
15,0	5%
15,0	Stop

*: tempo em minutos; ppm: parte por milhão.

FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

3.2.9 Análise estatística do planejamento experimental da extração de compostos fenólicos

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Protimiza®, executando análise de variância e o teste de comparação das médias pelo teste de Tukey com $\alpha = 5\%$.

3.2.10 Avaliação da viabilidade celular do extrato do resíduo da produção de vinho

3.2.10.1 Coleta das células mononucleares de sangue periférico (PBMCs)

Após assinatura do Termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), as PBMCs foram coletadas por punção venosa usando tubos de coleta de sangue BD Vacutainer® BD Biosciences (San Diego, CA, EUA) com anticoagulante K2-EDTA (1,8 mg/mL) de um indivíduo adulto saudável. Para o isolamento de PBMCs, 20 mL de amostras de sangue foram transferidos e separadas em tubos de 15 mL contendo meio de gradiente de densidade celular Histopaque®-1077 (1,077 g/mL) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) (2:1). Para coleta da interfase, os tubos foram centrifugados por 30 min a 1800 rpm e as PBMCs coletadas e transferidas para um novo tubo, lavadas com solução fisiológica (0.9%) e centrifugadas por 10 min a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e em seguida foram adicionados 5 mL de tampão

hemolítico, a fim de remover resquícios de hemácias. As células foram centrifugadas novamente por 10 min a 1500 rpm, o sobrenadante foi descartado e as mesmas lavadas novamente com solução fisiológica (0.9%). Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Gibco™ Thermo Fisher Scientific (Grand Island, NY, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), suplementado com penicilina/estreptomicina e anfotericina B e cultivadas em placas com 96 poços.

3.2.10.2 Avaliação da viabilidade celular

O teste de viabilidade celular objetiva analisar células metabolicamente ativas em uma cultura celular, a fim de avaliar sua atividade qualitativa e quantitativamente. Os ensaios de viabilidade celular são usados para triar moléculas que possuem efeitos na proliferação celular ou efeitos tóxicos que eventualmente podem conduzi-las a morte (ROGERO et al., 2000).

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) - 2,5-difenil-2H-tetrazólio). Os PBMCs foram tratados por 24 h com concentrações de 500, 1000 e 10000 ug/mL do extrato obtido a partir do resíduo da produção do vinho. As concentrações do extrato foram baseadas no trabalho de Grace et al., 2018.

O reagente MTT foi adicionado a uma placa de 96 poços contendo a amostra tratada, que foi incubada por 2 h a 37 °C. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 200 µL de DMSO (dimetilsulfóxido). A absorbância foi lida em um espectrofotômetro a 570 nm (MOSMANN, 1983).

3.2.10.3 Marcadores do estresse oxidativo

O estresse oxidativo é consequência da formação excessiva de espécies reativas de oxigênio geradas normalmente pelo metabolismo celular. Essa produção excessiva ocasiona a perda de capacidade de defesa e de reparo, levando a danos nas biomoléculas. O objetivo do ensaio foi verificar os efeitos do estresse oxidativo em células tratadas com o extrato do resíduo da produção de vinho.

Para quantificar a atividade antioxidante foi determinada a quantidade de tióis não protéicos (NPSH) através do método de Boyne e Ellman (1972) com modificações. A análise de óxido nítrico foi precedida conforme os protocolos de

Zahedi et al. (2008) e Tatsch et al. (2011). A geração de EROs foi avaliada usando um indicador de sinal fluorescente permeável às células 2,7 diclorodihidrofluoresceína-diacetato (H2DCF-DA), no qual, a intensidade de fluorescência DCF foi medida em Ex./Em. = 488/525 nm (YIN et al., 2017).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DA BIOMASSA

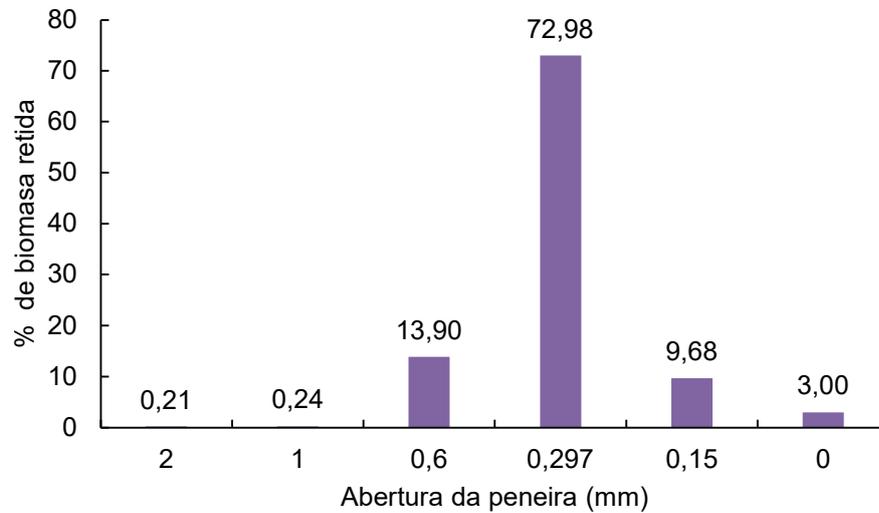
A seguir serão apresentados os resultados da caracterização da biomassa obtida do resíduo da produção de vinho, quanto à distribuição granulométrica e aos teores de umidade.

4.1.1 Distribuição granulométrica da biomassa

A análise granulométrica do material vegetal é uma etapa fundamental para a padronização de um processo extrativo, visto que partículas com dimensões homogêneas aumentam a área de contato entre o material vegetal e o líquido extrator, podendo aumentar, dessa forma, a eficiência da extração. Além disso, menores partículas apresentam maiores áreas superficiais e, conseqüentemente, maior área de contato com o líquido extrator, facilitando o processo de extração. (COSTA; BUCEK, 2017).

Para entender a distribuição granulométrica da matéria-prima utilizada nesse estudo, realizou-se a separação granulométrica da biomassa passando o material por peneiras na Série de Taylor com abertura de 9 (2mm), 16 (1mm), 30 (0,6mm), 60 (0,297mm) e 100 (0,15mm) *mesh*. Após a separação e análise granulométrica da biomassa, a fração mássica retida foi calculada e os valores estão dispostos na Figura 19.

Figura 19- PORCENTAGEM DE PARTÍCULAS RETIDAS EM FUNÇÃO DA ABERTURA DA PENEIRA PELA SÉRIE TYLOR



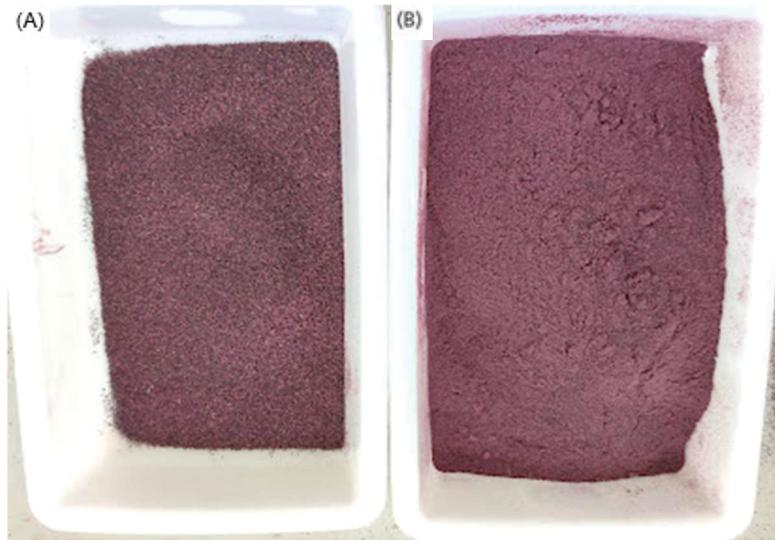
FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

De acordo com a análise granulométrica constatou-se aproximadamente 73 % das partículas ficaram retidas na malha de 0,297 mm, correspondendo ao *mesh* de 60, ou seja, a maioria das partículas ficaram retidas nesta malha. Observa-se também, que mais de 82 % da biomassa está concentrada entre as malhas de 0,6 mm (*mesh* 30) e 0,15 mm (*mesh* 100), demonstrando a homogeneidade do material. Essa homogeneidade é possivelmente resultado das etapas de secagem e moagem da biomassa que foram realizadas anteriormente.

Reservou-se para a realização dos experimentos a biomassa com partículas menores que 0,6 mm, as quais ficaram retidas nas peneiras de 60 *mesh* (0,297mm) e 100 *mesh* (0,15mm), juntamente com o material de fundo, que no total correspondem a 85,66% da biomassa, de acordo com o teste de granulometria. Essa fração da biomassa foi selecionada, para assim, se trabalhar com um material mais homogêneo e com tamanho de partícula menor, em relação a biomassa inicialmente obtida.

A Figura 20 retrata o aspecto da biomassa retido nas peneiras de 30 *mesh* (0,6mm) e a biomassa reservada para os demais experimentos, sendo essa última armazenada em bolsas hermeticamente fechadas, envolvidas com papel laminado para proteger da luz, dentro do freezer.

Figura 20-(A) BIOMASSA RETIDA NAS PENEIRAS DE 30 MESH E (B) BIOMASSA SEGREGADA PARA OS DEMAIS EXPERIMENTOS



FONTE: Acervo do autor, 2023.

A partir da análise granulométrica obteve-se também os diâmetros médios das partículas. A biomassa apresentou 0,285 mm de diâmetro superficial e 0,005 mm de diâmetro de Sauter.

4.1.2 Umidade da biomassa

A Tabela 6 apresenta os teores de umidade em termos de porcentagem, a primeira para o material logo após ser coletado (Biomassa 1) e a segunda com o material após a secagem e segmentação do tamanho das partículas (Biomassa 2).

Tabela 6- TEOR DE UMIDADE DA BIOMASSA IN NATURA E PROCESSADA/SECA

	Umidade em Estufa (%)
Biomassa 1	71,28 ± 0,65
Biomassa 2	10,17 ± 0,20

FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

Ao ser coletada a biomassa possuía significativa quantidade de suco remanescente do processo de fermentação, o que justifica o alto teor de umidade (71,28%). O processo de secagem da biomassa é muito importante para garantir que

a amostra permaneça estável durante o armazenamento, evitando o crescimento de microrganismos, bem como prevenir possível perda dos compostos bioativos (AGUILERA, et al., 1999). Por este motivo, foi realizada a secagem da biomassa. O processo foi realizado na temperatura de 50°C, a fim de evitar a exposição prolongada da matéria-prima a temperaturas mais elevadas, o que poderia ocasionar a perda de compostos bioativos. Ao término do processo de secagem, verificou-se que a biomassa permaneceu com 10,17 % de umidade.

4.2 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

4.2.1 Cinética de extração dos compostos fenólicos

O tempo de extração é uma variável crucial para processos extrativos. De acordo com Yingngam, Supaka e Rungseevijitprapa (2015), tempos reduzidos de extração não permitem a penetração eficiente do solvente no extrato, impedindo a extração dos compostos de interesse, já tempos muito elevados podem favorecer a degradação dos compostos extraídos. Portanto, inicialmente estudou-se a influência do tempo de extração para o resíduo da produção de vinho. As condições de extração foram: 60 g/L, ultrassom 100%, 50°C e 50% etanol.

Na Tabela 7 estão os resultados obtidos em termos de Atividade Antioxidante Total-AAT pelo método DPPH e Compostos Fenólicos Totais-CFT para os diferentes tempos testados.

Tabela 7- CINÉTICA DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Tempo (min)	CFT mgAG/g*	AAT μmolTrolox/g**
1	14,97 \pm 3,65 ^a	85,37 \pm 4,06 ^{ab}
15	20,13 \pm 2,09 ^a	111,46 \pm 3,28 ^a
60	18,91 \pm 3,40 ^a	80,16 \pm 6,27 ^{ab}
120	19,97 \pm 1,49 ^a	59,29 \pm 3,28 ^b

*CFT expressos em miligrama de ácido gálico equivalente por grama de biomassa. **AAT expressa em micro mol de Trolox equivalente por grama de biomassa. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente, segundo teste de Tukey ($p > 0,05$).

FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

Nesse experimento pode-se avaliar que os resultados não diferenciaram entre si. A partir do teste de Tukey com 95% de confiança não houve nenhuma diferença significativa entre os resultados para CFT e apenas dois pontos diferentes para os resultados de AAT. Sun et al. (2011) relataram que o tempo na extração de compostos fenólicos está associado a concentração final de compostos extraídos. Como no presente ensaio testou-se um intervalo de 120 minutos sem diferença significativa na concentração de compostos, conclui-se que outra variável poderia estar limitando o processo de extração.

Acredita-se que a razão sólido/líquido utilizada tenha sido alta e o equilíbrio químico do processo de extração foi atingido no início do processo, impossibilitando maior transferência de massa dos compostos fenólicos da fase sólida para a fase líquida, o que explicaria a igualdade dos resultados. Além disso, a biomassa utilizada é um resíduo industrial, ou seja, uma matéria-prima que já passou por diferentes processos, sendo assim, é possível que os compostos da biomassa estejam mais acessíveis, o que facilitaria o processo de extração, justificando o processo ter atingido o mais alto rendimento da análise já no primeiro ponto do ensaio, no tempo de 01 minuto.

Portanto a cinética de extração foi realizada utilizando uma razão sólido-líquido menor (20 g/L) e também se aumentou o número de pontos, ou seja, diminuiu-se o intervalo de tempo entre os ensaios para 15 minutos. Os resultados obtidos em termos de Atividade Antioxidante Total AAT pelo método DPPH, Compostos Fenólicos Totais (CFT) e índice PA para os diferentes tempos testados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8- SEGUNDA CINÉTICA DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Tempo (min)	CFT mgAG/g*	AAT μmolTrolox/g**	Índice PA***
0	13,82 ± 0,90 ^c	34,81 ± 4,69 ^d	0,91
15	19,84 ± 0,57 ^{ab}	73,29 ± 12,20 ^c	1,49
30	18,21 ± 0,16 ^{abc}	76,27 ± 3,28 ^c	1,44
45	21,38 ± 1,72 ^{ab}	85,30 ± 10,22 ^c	1,66
60	23,58 ± 1,30 ^a	106,46 ± 3,75 ^b	1,93
75	21,87 ± 0,11 ^{ab}	104,47 ± 9,38 ^b	1,84
90	17,40 ± 0,09 ^{bc}	111,41 ± 7,94 ^b	1,69
105	18,05 ± 1,11 ^{bc}	103,37 ± 4,80 ^b	1,65
120	17,07 ± 0,46 ^{ab}	124,88 ± 0,29 ^a	1,78

*CFT expressos em miligrama de ácido gálico equivalente por grama de biomassa. **AAT expressa em micro mol de Trolox equivalente por grama de biomassa. ***Para o cálculo do índice PA utilizou-se 23,58 como CFT_{maior} e 124,88 como AAT_{maior}. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente, segundo teste de Tukey (p>0,05).

FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

Nessa segunda cinética de extração pode-se perceber diferença significativa entre os diferentes tempos analisados, demonstrando a influência do tempo no processo. Para CFT os resultados variaram de 13,82 a 23,58 mgAG/g, sendo que o maior resultado foi obtido para o tempo de 60 minutos, o qual equivale aos resultados obtidos nos tempos de 15, 30, 45, 75 e 120 minutos, de acordo com o teste de Tukey.

O resultado obtido no tempo 0 (zero) demonstra que os compostos dessa matéria-prima se encontram facilmente disponíveis para extração, já que apenas misturando a biomassa com o solvente, foi possível extrair 13,82 mgAG/g. Vale ressaltar que o tempo 0 (zero) corresponde ao tempo que a amostra passa dentro do banho ultrassônico, não excluindo os demais tempos do processo de extração (mistura, centrifugação e filtração).

Já para AAT os resultados variaram de 34,81 e 124,88 μmolTE/g, sendo o menor resultado obtido para o tempo 0 (zero) e o maior resultado obtido para o tempo de 120 minutos, ambos diferentes dos outros tempos analisados, de acordo com o teste de Tukey.

Percebe-se que a partir de 60 minutos a extração se estabiliza e em tempos mais prologados ocorre uma redução nos resultados. É possível que tenha ocorrido a degradação dos compostos extraídos pela permanência da solução em contato com oxigênio, frequência de ultrassom e temperatura.

Considerando que o melhor resultados em termos de índice PA foi obtido no tempo de 60 minutos com PA igual a 1,93, o qual também foi o ensaio que apresentou maior rendimento em termos de CFT (23,58 mg/g), determinou-se a realização dos ensaios do planejamento experimental para otimização da extração com o tempo fixado em 60 minutos.

Tendo-se o ensaio de 60 minutos como melhor condição da cinética de extração, o extrato obtido foi analisado quanto a sua atividade antioxidante pelo método FRAP, a fim de possibilitar a comparação com outros estudos e entender a capacidade antioxidante por diferentes processos. O extrato apresentou $517,11 \pm 18,22$ μM sulfato ferroso/g de biomassa. Silva (2017) a partir de resíduos de uvas sem sementes fornecido por vinícolas obteve um extrato com atividade antioxidante de 249,36 $\mu\text{Mol Fe/g}$. Sendo que, a extração se deu em metanol 50 % na proporção de 1:5 m/v com agitação em *shaker* a 180rpm, por 60 min, com temperatura de 55°C.

O extrato obtido a partir do ensaio de 60 minutos também foi avaliado quanto ao seu perfil fenólico via HPLC-MS. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 9.

Tabela 9- PERFIL FENÓLICO OBTIDO COM EXTRAÇÃO DE 60 MINUTOS

Compostos	Concentração mg/g_{biomassa}
Ácido p-cumárico	0,019±0,00
Ácido siríngico	0,794±0,017
Ácido gálico	0,021±0,002

FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

Os ácidos foram os compostos mais presentes nessa amostra, enquanto os compostos quercetina, miricetina, kaempferol, ácido cafeíco, epicatequina, pirocatecol e flavona não foram identificados para essa extração. Uma vez que o processo extrativo ainda não foi avaliado quanto aos demais parâmetros do processo, espera-

se obter um perfil fenólico mais completo e com maior concentração de compostos bioativos.

4.2.2 Otimização das condições de extração com auxílio de planejamento experimental DCCR

O efeito das variáveis temperatura, concentração de etanol, razão sólido/líquido e potência de ultrassom foram avaliados no processo de extração dos compostos fenólicos para o resíduo da produção de vinho. A extração ocorreu no tempo fixado em 60 minutos para todos os ensaios.

4.2.2.1 Compostos Fenólicos Totais

Os resultados em termos de CFT do planejamento experimental estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10- MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DCCR E OS RESULTADOS OBTIDOS PARA COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Ensaio	(°C)	[] etanol %	(g/L)	Ultrassom (%)	CFT mgAG/g*
1	35 (-1)	20(-1)	12 (-1)	40(-1)	27,05 ± 2,65
2	65 (1)	20(-1)	12 (-1)	40(-1)	35,25 ± 1,75
3	35(-1)	60(1)	12 (-1)	40(-1)	28,06 ± 1,71
4	65 (1)	60(1)	12 (-1)	40(-1)	29,44 ± 3,15
5	35 (-1)	20(-1)	28 (1)	40(-1)	15,82 ± 0,84
6	65 (1)	20(-1)	28 (1)	40(-1)	28,91 ± 1,63
7	35(-1)	60(1)	28 (1)	40(-1)	24,96 ± 3,57
8	65(1)	60(1)	28 (1)	40(-1)	22,22 ± 1,35
9	35(-1)	20(-1)	12 (-1)	80 (1)	33,11 ± 3,61
10	65(1)	20(-1)	12 (-1)	80 (1)	31,36 ± 2,76
11	35 (-1)	60 (1)	12 (-1)	80(1)	32,10 ± 1,71
12	65(1)	60 (1)	12 (-1)	80(1)	29,85 ± 0,92
13	35(-1)	20(-1)	28 (1)	80(1)	20,68 ± 0,84
14	65(1)	20(-1)	28 (1)	80(1)	15,41 ± 0,91
15	35(-1)	60(1)	28 (1)	80(1)	21,51 ± 1,00
16	65(1)	60(1)	28 (1)	80(1)	11,81 ± 0,82
17	20(-2)	40(0)	20(0)	60(0)	19,33 ± 0,73
18	80(2)	40(0)	20(0)	60(0)	28,02 ± 0,57
19	50(0)	0(-2)	20(0)	60(0)	20,55 ± 1,36
20	50(0)	80(2)	20(0)	60(0)	22,14 ± 3,94
21	50(0)	40(0)	4(-2)	60(0)	51,21 ± 7,57
22	50(0)	40(0)	36(2)	60(0)	19,03 ± 0,70
23	50(0)	40(0)	20(0)	20(-2)	25,53 ± 1,08
24	50(0)	40(0)	20(0)	100(2)	29,64 ± 1,59
25	50(0)	40(0)	20(0)	60(0)	25,92 ± 1,82
26	50(0)	40(0)	20(0)	60(0)	24,13 ± 2,85
27	50(0)	40(0)	20(0)	60(0)	26,68 ± 1,80

*CFT expressos em miligrama de ácido gálico equivalente por grama de biomassa.

FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

Avaliando a Tabela 10, verificou-se que os resultados em termos de CFT variaram de 11,81 a 51,21 mgAG/g biomassa. Ressalta-se o ensaio 21, o qual apresentou melhor resultado, tanto em relação aos experimentos do DCCR como em relação aos resultados obtidos na cinética de extração.

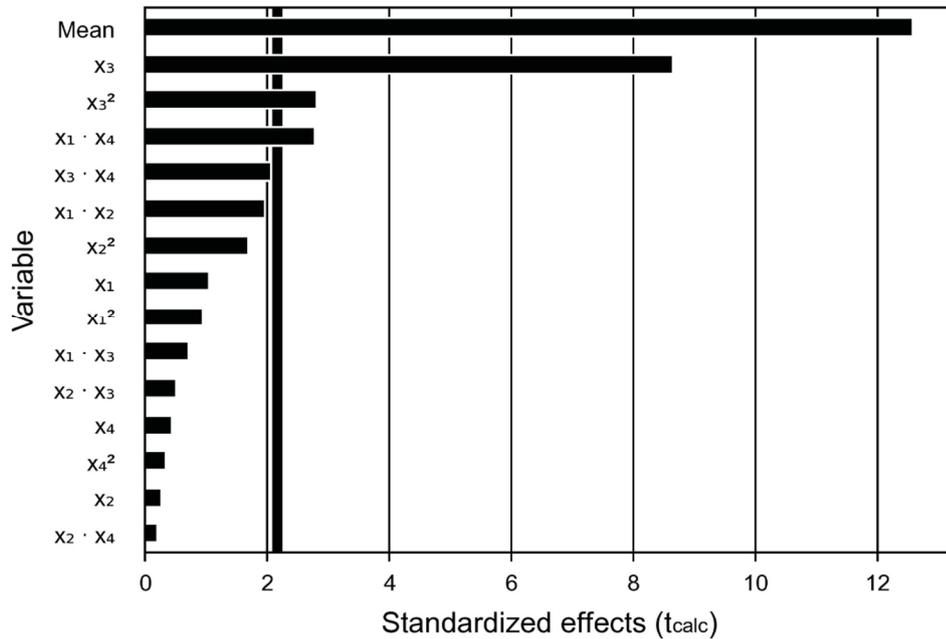
Braga et al. (2016) a partir do bagaço de uva liofilizado, em banho ultrassônico à temperatura ambiente por 15 minutos, utilizando etanol 80% obtiveram 60,28 mgAG/g biomassa. Enquanto Rockenbach et al. (2008) sob agitação mecânica durante 2 horas, utilizando acetona como solvente 50 e 70% (v/v) obtiveram nas melhores condições valores entre 65,6 e 79,5 mgAG/g a partir do bagaço de uva. Llobera e Cañellas (2007), a partir do bagaço de uvas tintas da variedade "Manto Negro" (*Vitis vinifera*), obtiveram teores médios de compostos fenólicos extraídos sequencialmente com metanol a 50% e acetona a 70% (v/v) entre 26,3 e 116,0 mgAG/g em peso seco. Moro et al., (2021) por meio da técnica de Hidrodifusão por Micro-ondas e Técnica de gravidade (MHG), extraíram do resíduo da vinificação tinta valores entre 3,3 e 118,1 mgGAE/g.

Diferentes preparos da matéria-prima e diferentes métodos extrativos podem ser os responsáveis pela diferença nos rendimentos obtidos nesse trabalho e dos reportados na literatura. Contudo, vale destacar que para o trabalho em questão as sementes foram retiradas do bagaço de uva, o que proporciona características diferentes para matéria-prima utilizada na extração. Ainda se ressalta a diferença de soluções extratoras, de acordo com Magro; Castro (2020), uma comparação entre solventes é de extrema importância para se determinar a melhor solução extratora de compostos antioxidantes em estudo. Entretanto, deve-se levar em consideração a aplicação posterior do extrato.

Para esse estudo de otimização, analisando a Figura 21, observa-se que das quatro variáveis estudadas no DCCR apenas a razão sólido/líquido demonstrou a 95% de confiança, significância para a extração de compostos fenólicos totais. A diminuição na razão sólido/líquido representa um aumento no rendimento em termos de CFT. Tal condição pode ser explicada uma vez que quanto maior a quantidade de solução extratora, maior o gradiente de concentração entre a matéria-prima e a solução, resultando, portanto, em uma extração mais eficiente.

No que se refere ao efeito entre as variáveis, houve efeito significativo entre as variáveis (temperatura e ultrassom) e (razão sólido/líquido e ultrassom), ambos negativo, para a obtenção de compostos fenólicos.

Figura 21- PARETO COM OS EFEITOS PADRONIZADOS E AS INTERAÇÕES PARA COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS PELO DCCR



Variáveis: X₁: Temperatura (°C); X₂: concentração de etanol (%); X₃: razão sólido/líquido (g/L); X₄: potência de ultrassom (%).

FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

A partir destes resultados, a 95% de confiança, o modelo matemático codificado de segunda ordem para a extração de compostos fenólicos foi validado (Equação 7) pela análise de variância, onde o F_{calc} (7,9) foi quatro vezes maior que o F_{tab} , possibilitando a obtenção de uma superfície de resposta com $R^2=0,9023$.

$$Y = 25.58 + 0.76 x_1 - 0.72 x_1^2 - 0.19 x_2 - 1.30 x_2^2 - 6.22 x_3 + 2.14 x_3^2 - 0.32 x_4 + 0.26 x_4^2 - 1.72 x_1 x_2 - 0.64 x_1 x_3 - 2.43 x_1 x_4 + 0.44 x_2 x_3 - 0.18 x_2 x_4 - 1.82 x_3 x_4$$

(Equação 7)

Onde:

X₁ = temperatura (°C);

X₂ = concentração de etanol (%)

X₃ = Razão sólido/líquido (g/L)

X₄ = Potência de ultrassom (%)

No estudo de Gruz et al. (2013), para extração com bagaço de uva, a razão solvente/substrato e a temperatura foram parâmetros estatisticamente significativos

para todas as variáveis resposta avaliadas, sendo elas: teor de compostos fenólicos totais, teor de antocianinas totais e monoméricas, bem como a capacidade antioxidante pelo método ABTS. Sendo que o aumento da temperatura atuou mais fortemente que a razão solvente/substrato. O aumento do teor de etanol também favoreceu a extração dos compostos fenólicos totais.

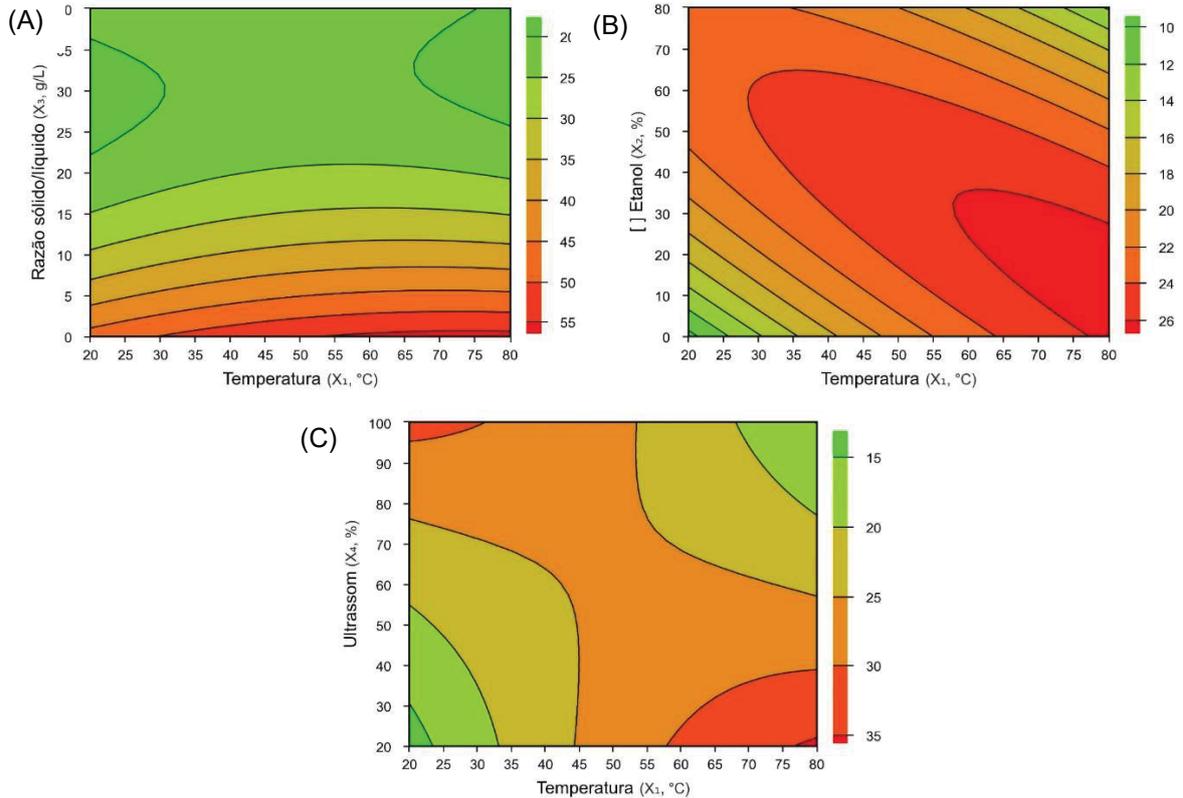
A concentração de etanol não demonstrou efeito significativo nesse estudo, contudo percebe-se pela Tabela 10, que nas condições de maior concentração, como no ensaio 16, estão os menores resultados em termos de CFT. Os estudos de Peng, Bishop e Quek (2019) citam que a polaridade do solvente pode favorecer a extração para a obtenção de determinados compostos de interesse. Ao aumentar a concentração de etanol na solução aquosa de extração, a polaridade do sistema diminui.

Além disso, é importante ressaltar que não existe um único solvente que seja capaz de extrair todas as classes de compostos fenólicos de uma matriz simultaneamente, devido a diversos fatores, que envolvem a natureza do composto e a interação do composto antioxidante com as moléculas de carboidratos e proteínas presentes na matéria-prima. Sendo assim, existem solventes que extraem melhor um tipo específico de composto do que outro (BIESAGA, 2011; MOKRANI; MADANI, 2016). O que demonstra a importância de estudos para se determinar a melhor solução extratora dos compostos de interesse para determinada matéria-prima.

Para esse estudo a temperatura não demonstrou efeito significativo, contudo, como pode-se observar através da Figura 22, os gráficos de contorno obtidos a partir do modelo estatístico, demonstram que temperaturas mais altas favorecem a extração dos compostos fenólicos. Rendimentos maiores em termos de CFT são obtidos ao utilizar-se elevadas temperaturas em conjunto com baixa razão sólido/líquido, baixa concentração de etanol e baixa potência de ultrassom. Contudo, para tal efeito, são necessárias temperaturas próximas a 80°C, o que pode favorecer a degradação dos compostos fenólicos durante o processo de extração.

Devido a interação significativa negativa da temperatura com a potência de ultrassom e como pode ser visualizado na Figura 22 (C), usando-se altas potência de ultrassom, o modelo estatístico demonstrou que temperaturas mais baixas seriam ideais, assim como, para baixas potências de ultrassom altas temperaturas seriam mais eficientes.

Figura 22- GRÁFICOS DE CONTORNO CORRELACIONANDO A VARIÁVEL TEMPERATURA



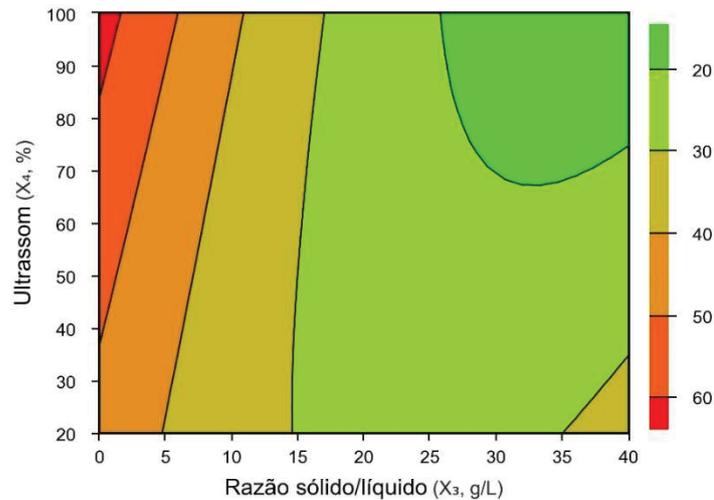
Gráficos de contorno relacionando as variáveis: Figura A: temperatura (X_1) e razão sólido/líquido (X_3); Figura B: temperatura (X_1) e concentração de etanol (X_2); Figura C: temperatura (X_1) e ultrassom (X_4);

FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

Mazza et al. (2016) realizaram a otimização do processo de extração do bagaço de uva proveniente da produção de espumantes, através de extração etanólica, com adição de ácido cítrico, assistida por ultrassom. Os resultados variaram de 64,85 a 117,32 mg/g. As extrações mais eficientes ocorreram quando foram utilizadas potências de ultrassom mais altas, maiores concentrações de ácido e menor razão sólido/líquido. González-Centeno et al. (2014), também obtiveram maior teor de compostos fenólicos de bagaço de uva com o aumento da potência de ultrassom.

Apesar de a potência de ultrassom não ter se mostrado significativa para esse estudo, através da Figura 23 pode-se observar que o aumento da potência de ultrassom favorece a extração, quando associada a baixas razões sólido/líquido, variável significativa para o processo. Além disso, a interação entre essas duas variáveis também se demonstrou significativa para o processo de extração.

Figura 23- CURVA DE CONTOURNO PARA AS VARIÁVEIS ULTRASSOM E RAZÃO SÓLIDO/LÍQUIDO



FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

Ainda no que se refere a potência de ultrassom, Maksimovica, Ivanovica e Skalaa (2012) observaram que quanto menor o diâmetro médio da partícula combinado com uma maior agitação do sistema, maior é o rendimento da extração.

De forma geral, a literatura aponta que, na maioria dos casos, o aumento da temperatura, da razão solvente/substrato e do teor de solvente melhora os processos extrativos. Contudo, as características da matéria-prima empregada e dos compostos de interesse são primordiais para se estabelecer a condição operacional mais favorável do ponto de vista termodinâmico e econômico.

Para esse estudo, a partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que para se obter os melhores rendimentos em termos de CFT, é necessário aplicar-se razões sólido/líquido menores que 5,0 g/L. As demais variáveis não afetaram significativamente os resultados. Contudo, nas condições de alta potência de ultrassom, temperaturas em torno de 50°C e concentração de etanol entre 40 e 50%, foram obtidos os maiores resultados para compostos fenólicos totais.

4.2.2.2 Atividade Antioxidante Total pelo método DPPH

Os resultados em termos de AAT pelo método DPPH do planejamento experimental estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11- MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DCCR E OS RESULTADOS OBTIDOS PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

Ensaio	(°C)	[] etanol %	(g/L)	Ultrassom (%)	AAT $\mu\text{mol Trolox/g}^*$
1	35 (-1)	20(-1)	12 (-1)	40(-1)	143,87 \pm 1,30
2	65 (1)	20(-1)	12 (-1)	40(-1)	92,51 \pm 1,95
3	35(-1)	60(1)	12 (-1)	40(-1)	83,41 \pm 5,85
4	65 (1)	60(1)	12 (-1)	40(-1)	93,16 \pm 0,00
5	35 (-1)	20(-1)	28 (1)	40(-1)	51,91 \pm 1,95
6	65 (1)	20(-1)	28 (1)	40(-1)	84,23 \pm 4,18
7	35(-1)	60(1)	28 (1)	40(-1)	50,51 \pm 0,56
8	65(1)	60(1)	28 (1)	40(-1)	64,44 \pm 5,02
9	35(-1)	20(-1)	12 (-1)	80 (1)	53,72 \pm 1,23
10	65(1)	20(-1)	12 (-1)	80 (1)	101,61 \pm 4,55
11	35 (-1)	60 (1)	12 (-1)	80(1)	86,01 \pm 0,65
12	65(1)	60 (1)	12 (-1)	80(1)	101,61 \pm 12,35
13	35(-1)	20(-1)	28 (1)	80(1)	48,01 \pm 3,62
14	65(1)	20(-1)	28 (1)	80(1)	46,61 \pm 3,34
15	35(-1)	60(1)	28 (1)	80(1)	68,90 \pm 1,67
16	65(1)	60(1)	28 (1)	80(1)	59,15 \pm 4,74
17	20(-2)	40(0)	20(0)	60(0)	59,41 \pm 1,17
18	80(2)	40(0)	20(0)	60(0)	62,14 \pm 3,12
19	50(0)	0(-2)	20(0)	60(0)	31,32 \pm 5,07
20	50(0)	80(2)	20(0)	60(0)	65,26 \pm 6,24
21	50(0)	40(0)	4(-2)	60(0)	59,09 \pm 5,85
22	50(0)	40(0)	36(2)	60(0)	69,63 \pm 2,17
23	50(0)	40(0)	20(0)	20(-2)	67,99 \pm 1,17
24	50(0)	40(0)	20(0)	100(2)	107,00 \pm 5,07
25	50(0)	40(0)	20(0)	60(0)	52,78 \pm 3,90
26	50(0)	40(0)	20(0)	60(0)	59,41 \pm 5,07
27	50(0)	40(0)	20(0)	60(0)	44,78 \pm 1,76

. *AAT expressa em micro mol de Trolox equivalente por grama de biomassa.

FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

No que se refere a atividade antioxidante total os resultados apresentaram uma variação de 31,32 a 143,87 $\mu\text{mol TE/g}$. O ensaio 1 foi o mais efetivo para aumentar a atividade antioxidante total do extrato. Percebe-se que a condição de extração que apresentou maior atividade antioxidante não foi a que apresentou maior

concentração de compostos fenólicos totais. Tiveron et al., (2012) evidenciam que a falta de correlação entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante pode ser explicada pela alta variedade de compostos fenólicos e não fenólicos que exercem atividade antioxidante, e que nem sempre a presença elevada dessa variedade de compostos resultará em uma maior atividade antioxidante do extrato.

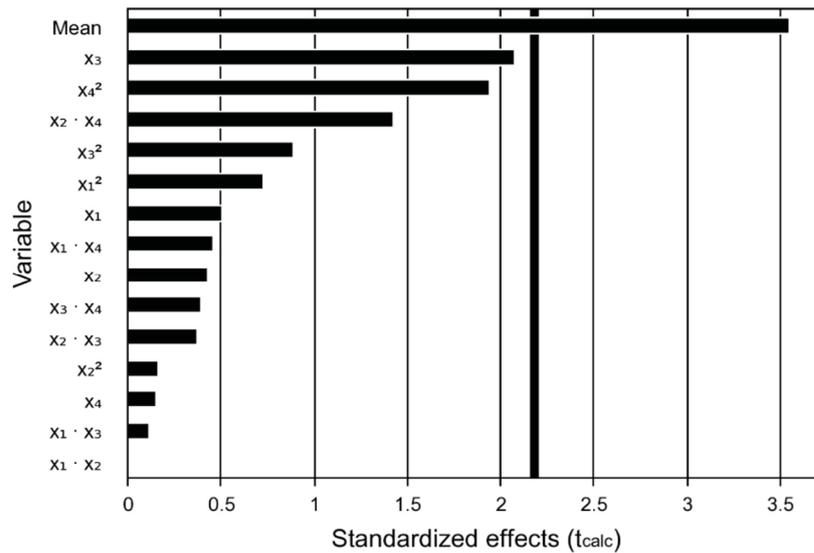
A condição 19 foi a menos efetiva para a atividade antioxidante total do extrato. Observa-se que nesta condição a concentração de etanol foi igual a zero, ou seja, a extração ocorreu utilizando-se água como solvente. A literatura reporta que a presença de água beneficia os processos extrativos realizados por ultrassom, uma vez que favorece o aumento da intensidade da cavitação das ondas pelo aumento da tensão superficial e decréscimo da viscosidade. Entretanto, extrações com quantidade de água superior a 60% podem prejudicar a extração, pois induz ao aumento dos radicais de dissociação da água (SHIRSATH; SONAWANE; GOGATE, 2012).

Rockenbach (2008) a partir das uvas *Pinot Noir* e *Regente*, em extrações usando etanol, metanol e acetona 50% em meio aquoso acidificado com HCl 0,1% v/v, obteve, em média 480 e 479 $\mu\text{Mol TEAC/g}$ pelo método DPPH, respectivamente. Já Soares (2008) obteve 197,00 e 189,82 $\mu\text{mol TE/g}$ pelo método DPPH para as cultivares Isabel e Niágara, respectivamente, realizando a extração a partir da fruta, usando como extrato acetona 75%. Rocha (2018) a partir de uma extração aquosa acidificada (2% de ácido cítrico), obteve em sua melhor condição de extração com micro-ondas, 33,27 $\mu\text{mol TE/g}$ do bagaço do suco da uva.

Mais uma vez, diferentes preparos da matéria-prima e diferentes métodos extrativos podem ser os responsáveis pela diferença nos rendimentos obtidos nesse trabalho e dos reportados na literatura.

Para os resultados em termos de atividade antioxidante pelo método DPPH, observa-se que pela Figura 24, que das quatro variáveis estudadas no DCCR nenhuma demonstrou a 95% de confiança, significância para a extração de compostos fenólicos totais.

Figura 24- PARETO COM OS EFEITOS PADRONIZADOS E AS INTERAÇÕES PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DPPH



Variáveis: X_1 : Temperatura ($^{\circ}\text{C}$); X_2 : concentração de etanol (%); X_3 : razão sólido/líquido (g/L); X_4 : potência de ultrassom (%).

FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

A partir dos resultados do DCCR em termos de Atividade Antioxidante Total, não foi possível a validação do modelo matemático codificado de segunda ordem, a 95% de confiança. Concluindo que, os valores obtidos experimentalmente não podem ser representados pelo modelo estatístico desenvolvido.

Destaca-se que para a atividade antioxidante, algumas análises apresentaram variabilidade acima do esperado, o que pode ter ocorrido em consequência da escolha do método utilizado. A avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH consiste em medir via espectrometria o decréscimo na concentração do DPPH pela reação deste radical com um antioxidante. Essa metodologia, ainda que aplicada em sistemas simples, apresenta diversas dificuldades que podem alterar o resultado das análises. A quantidade e o tipo do solvente utilizado para a dissolução antioxidante, o teor de água e as concentrações de íons metálicos no sistema podem interferir diretamente na quantidade de DPPH não reagida (DAWIDOWICZ; WIANOWSKA; OLSZOWY, 2012).

Considerando que no presente estudo, as diversas amostras testadas possuíam diferentes concentrações de água, etanol e de soluto, é possível que tais condições tenham afetado os resultados de atividade antioxidante em termos de DPPH.

4.2.2.3 Índice PA

Os resultados em termos de índice PA do planejamento experimental estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12- MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DCCR E OS RESULTADOS OBTIDOS PARA CFT, AAT E ÍNDICE PA

Ensaio	(°C)	[] etanol %	(g/L)	Ultrassom (%)	CFT mgAG/g*	AAT μ molTrolox/g**	Índice PA***
1	35 (-1)	20(-1)	12 (-1)	40(-1)	27,05 \pm 2,65	143,87 \pm 1,30	1,53
2	65 (1)	20(-1)	12 (-1)	40(-1)	35,25 \pm 1,75	92,51 \pm 1,95	1,36
3	35(-1)	60(1)	12 (-1)	40(-1)	28,06 \pm 1,71	83,41 \pm 5,85	1,19
4	65 (1)	60(1)	12 (-1)	40(-1)	29,44 \pm 3,15	93,16 \pm 0,00	1,26
5	35 (-1)	20(-1)	28 (1)	40(-1)	15,82 \pm 0,84	51,91 \pm 1,95	0,69
6	65 (1)	20(-1)	28 (1)	40(-1)	28,91 \pm 1,63	84,23 \pm 4,18	1,17
7	35(-1)	60(1)	28 (1)	40(-1)	24,96 \pm 3,57	50,51 \pm 0,56	0,86
8	65(1)	60(1)	28 (1)	40(-1)	22,22 \pm 1,35	64,44 \pm 5,02	0,90
9	35(-1)	20(-1)	12 (-1)	80 (1)	33,11 \pm 3,61	53,72 \pm 1,23	1,05
10	65(1)	20(-1)	12 (-1)	80 (1)	31,36 \pm 2,76	101,61 \pm 4,55	1,35
11	35 (-1)	60 (1)	12 (-1)	80(1)	32,10 \pm 1,71	86,01 \pm 0,65	1,26
12	65(1)	60 (1)	12 (-1)	80(1)	29,85 \pm 0,92	101,61 \pm 12,35	1,32
13	35(-1)	20(-1)	28 (1)	80(1)	20,68 \pm 0,84	48,01 \pm 3,62	0,76
14	65(1)	20(-1)	28 (1)	80(1)	15,41 \pm 0,91	46,61 \pm 3,34	0,64
15	35(-1)	60(1)	28 (1)	80(1)	21,51 \pm 1,00	68,90 \pm 1,67	0,82
16	65(1)	60(1)	28 (1)	80(1)	11,81 \pm 0,82	59,15 \pm 4,74	0,66
17	20(-2)	40(0)	20(0)	60(0)	19,33 \pm 0,73	59,41 \pm 1,17	0,81
18	80(2)	40(0)	20(0)	60(0)	28,02 \pm 0,57	62,14 \pm 3,12	1,00
19	50(0)	0(-2)	20(0)	60(0)	20,55 \pm 1,36	31,32 \pm 5,07	0,63
20	50(0)	80(2)	20(0)	60(0)	22,14 \pm 3,94	65,26 \pm 6,24	0,91
21	50(0)	40(0)	4(-2)	60(0)	51,21 \pm 7,57	59,09 \pm 5,85	1,42
22	50(0)	40(0)	36(2)	60(0)	19,03 \pm 0,70	69,63 \pm 2,17	0,88
23	50(0)	40(0)	20(0)	20(-2)	25,53 \pm 1,08	67,99 \pm 1,17	0,99
24	50(0)	40(0)	20(0)	100(2)	29,64 \pm 1,59	107,00 \pm 5,07	1,35
25	50(0)	40(0)	20(0)	60(0)	25,92 \pm 1,82	52,78 \pm 3,90	0,89
26	50(0)	40(0)	20(0)	60(0)	24,13 \pm 2,85	59,41 \pm 5,07	0,90
27	50(0)	40(0)	20(0)	60(0)	26,68 \pm 1,80	44,78 \pm 1,76	0,85

*CFT expressos em miligrama de ácido gálico equivalente por grama de biomassa. **AAT expressa em micro mol de Trolox equivalente por grama de biomassa. ***Para o cálculo do índice PA utilizou-se 51,21 como CFT_{maior} e 143,87 como AAT_{maior}.

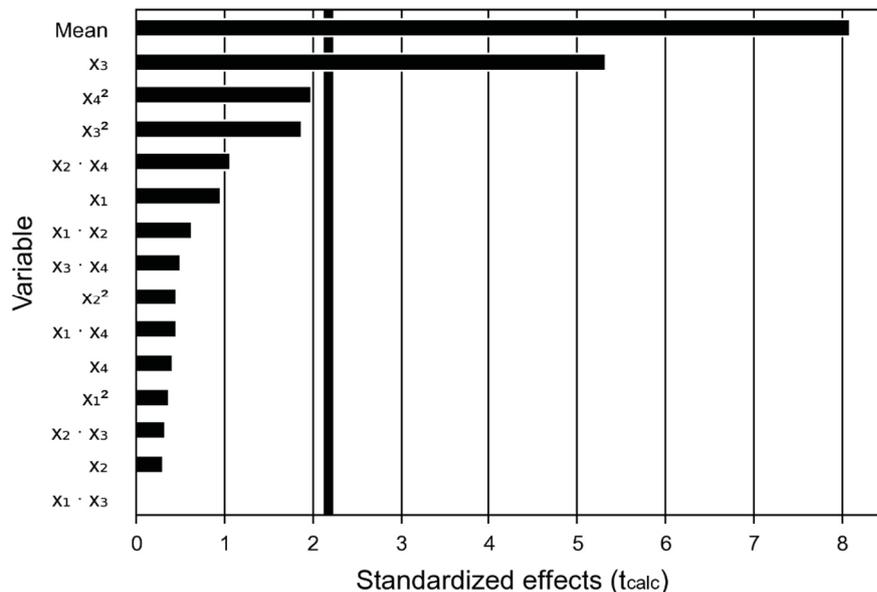
FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

Destacam-se como melhores resultados os ensaios 1 e 21 com índice PA igual a 1,53 e 1,42, respectivamente. Sendo o ensaio 1 o melhor resultado obtido para AAT e o ensaio 21 o melhor resultado obtido para CFT. Com os menores índice PA estão os ensaios 19 e 14, com 0,63 e 0,64, respectivamente.

Os resultados em termos de índice PA foram avaliados estatisticamente e foi possível observar que a variável razão sólido/líquido foi importante para aumentar o índice PA. Analisando os ensaios da Tabela 12, observa-se que os ensaios em que a razão sólido-líquido foi de 4 ou 12 g/L, as respostas em termos de índice PA foram maiores que 1.

Conforme pode ser observado no gráfico de Pareto (Figura 25), a razão sólido-líquido se apresenta como variável significativa negativa, da mesma forma que ocorreu para o resultado em termos de Compostos Fenólicos Totais.

Figura 25- PARETO COM OS EFEITOS PADRONIZADOS E AS INTERAÇÕES PARA ÍNDICE PA PELO DCCR



Variáveis: X₁: Temperatura (°C); X₂: concentração de etanol (%); X₃: razão sólido/líquido (g/L); X₄: potência de ultrassom (%).

FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

A partir da análise estatística o modelo matemático codificado de segunda ordem, não foi validado pela análise de variância para os resultados em termos de índice PA. Assim como ocorreu para a AAT pelo método DPPH, os valores obtidos

experimentalmente não podem ser representados pelo modelo estatístico desenvolvido.

Vale ressaltar que, para Índice PA, é possível que a validação do modelo não tenha ocorrido uma vez que, para o cálculo do índice PA é necessário utilizar o valor obtido experimental para AAT via DPPH, o qual não teve um modelo matemático validado, e como já mencionado, percebeu-se variabilidade nas análises de AAT pelo método DPPH.

4.2.2.4 Perfil fenólico obtido por HPLC

No que se refere ao perfil fenólico das amostras, o qual foi determinado via HPLC-MS, a Tabela 13 apresenta os resultados da quantificação dos compostos individuais relacionando-os com todas as condições experimentais avaliadas. Dos onze compostos individuais analisados por HPLC-MS, cinco foram identificados nos extratos do resíduo da produção de vinho: quercetina, miricetina, ácido p-cumárico, ácido siríngico e ácido gálico.

Tabela 13- MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DCCR E PERFIL FENÓLICO OBTIDO POR HPLC-MS

Ensaio	(°C)	Etanol %	(g/L)	Ultrasom (%)	Quercetina	Miricetina	Ácido p-cumárico	Ácido siríngico	Ácido gálico
1	35 (-1)	20(-1)	12 (-1)	40(-1)	ND	ND	0,011	2,020	0,029
2	65 (1)	20(-1)	12 (-1)	40(-1)	ND	ND	0,011	2,292	0,039
3	35(-1)	60(1)	12 (-1)	40(-1)	ND	ND	0,012	2,175	0,055
4	65 (1)	60(1)	12 (-1)	40(-1)	ND	ND	0,012	1,935	0,053
5	35 (-1)	20(-1)	28 (1)	40(-1)	ND	ND	0,006	1,003	0,019
6	65 (1)	20(-1)	28 (1)	40(-1)	ND	ND	0,005	1,140	0,035
7	35(-1)	60(1)	28 (1)	40(-1)	ND	ND	0,007	1,106	0,036
8	65(1)	60(1)	28 (1)	40(-1)	0,007	0,004	0,007	1,142	0,039
9	35(-1)	20(-1)	12 (-1)	80 (1)	ND	ND	0,013	2,139	0,036
10	65(1)	20(-1)	12 (-1)	80 (1)	ND	ND	0,014	2,290	0,043
11	35 (-1)	60 (1)	12 (-1)	80(1)	ND	ND	0,012	2,040	0,055
12	65(1)	60 (1)	12 (-1)	80(1)	ND	ND	0,016	3,173	0,077
13	35(-1)	20(-1)	28 (1)	80(1)	ND	ND	0,006	0,992	0,019
14	65(1)	20(-1)	28 (1)	80(1)	0,019	0,006	0,008	1,207	0,042
15	35(-1)	60(1)	28 (1)	80(1)	ND	ND	0,006	0,894	0,028
16	65(1)	60(1)	28 (1)	80(1)	ND	ND	0,007	0,954	0,020
17	20(-2)	40(0)	20(0)	60(0)	ND	ND	0,009	1,467	0,047
18	80(2)	40(0)	20(0)	60(0)	ND	ND	0,006	1,262	0,025
19	50(0)	0(-2)	20(0)	60(0)	0,021	ND	0,010	1,460	0,068
20	50(0)	80(2)	20(0)	60(0)	ND	ND	0,005	0,940	0,013
21	50(0)	40(0)	4(-2)	60(0)	ND	ND	0,067	9,388	0,338
22	50(0)	40(0)	36(2)	60(0)	ND	ND	0,005	0,881	0,029

23	50(0)	40(0)	20(0)	20(-2)	ND	ND	0,010	1,683	0,046
24	50(0)	40(0)	20(0)	100(2)	ND	ND	0,010	1,669	0,049
25	50(0)	40(0)	20(0)	60(0)	ND	ND	0,010	1,704	0,048
26	50(0)	40(0)	20(0)	60(0)	ND	ND	0,011	1,566	0,047
27	50(0)	40(0)	20(0)	60(0)	ND	ND	0,011	1,604	0,047

Resultados expressos em mg/g_{biomassa}. ND- Não detectado.

FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

A quantificação dos compostos fenólicos mostrou que os compostos mais presentes no extrato foram os ácidos fenólicos. O ácido siríngico foi composto mais presente nos extratos, sendo detectado em todas as condições avaliadas no planejamento experimental. O ácido p-cumárico e ácido gálico também se mostraram presentes em todos os ensaios, porém, em menor quantidade em relação ao ácido siríngico. Fu-xiang et al. (2019) usaram onze cultivares de uva para analisar as diferenças de variedade de perfis fenólicos de uva fresca. Eles descrevem que a composição de compostos fenólicos nas polpas de uva foi semelhante ao de compostos nas cascas. No entanto, o teor de compostos fenólicos nas polpas de uva foi inferior ao das cascas. Os autores ainda determinaram que os ácidos foram os compostos fenólicos mais abundantes nas polpas de uva. O que condiz com os resultados obtidos nesse estudo.

Moro et al. (2021) por meio da técnica de Hidrodifusão por Micro-ondas e Técnica de gravidade (MHG) extraíram compostos fenólicos de um subproduto da vinificação tinta e identificaram sete diferentes compostos fenólicos: ácidos gálico, siríngico e vanílico, procianidina B2, catequina, epicatequina e quercetina. Sendo o ácido gálico o mais abundante para a variedade Gold Finger (0,0449 mg/g). Enquanto que nesse estudo, na melhor condição (ensaio 21), obteve-se 9,388 mg/g de ácido siríngico.

Nos ensaios 8, 14 e 19 foi detectado a quercetina, que se trata de um flavonóide, o qual está presente somente na casca da uva, na forma de glicosídeos, e nos ensaios 8 e 14 também foi quantificado miricitina. Esses compostos, embora presentes em menor quantidade nas uvas, possuem importante papel no desenvolvimento da coloração, atuando como co-pigmentos junto às antocianinas (TEIXEIRA et al., 2014).

4.2.2.5 Validação do modelo estatístico

Uma vez obtido um modelo matemático validado estatisticamente para CFT, testou-se uma condição experimental, diferente das já analisadas, a fim de verificar experimentalmente o resultado proposto pelo modelo matemático. As condições de extração foram: 65°C, 40% de etanol, 4 g/L e 100% de ultrassom. As variáveis codificadas para essas condições foram inseridas na equação 7 a fim de se calcular

os resultados para CFT. Na Tabela 14 estão os resultados obtidos experimentalmente para a condição estudada, bem como, os resultados obtidos pelo modelo matemático.

Tabela 14- RESULTADOS OBTIDOS ESTATÍSTICAMENTE E EXPERIMENTALMENTE PARA COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL E ÍNDICE PA

	Modelo	Experimental	% Desvio
CFT	50,72	52,63±3,72	3,76
DPPH	155,91	-	-
Índice PA	1,98	-	-

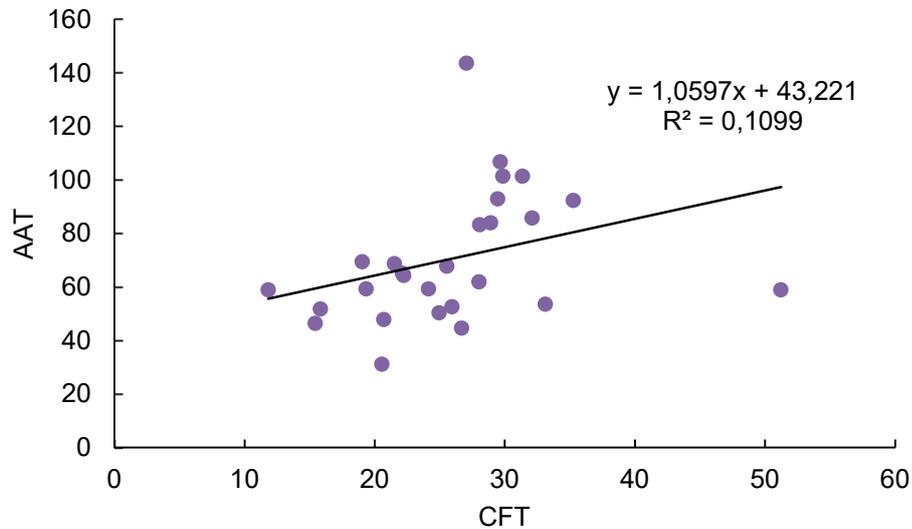
*CFT expressos em miligrama de ácido gálico equivalente por grama de biomassa. **AAT expressa em micro mol de Trolox equivalente por grama de biomassa. ***Para o cálculo do índice PA utilizou-se 51,21 como CFT_{maior} e 143,87 como AAT_{maior}.

FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

A partir dos resultados obtidos, pode ser observar que o modelo para compostos fenólicos representou de maneira eficaz os resultados obtidos experimentalmente, dessa forma, sendo validado experimentalmente. No que refere aos resultados quanto a Atividade Antioxidante Total e Índice PA, os resultados experimentais não podem ser representados pelo modelo estatístico.

É importante ressaltar também que, para o planejamento realizado nesse estudo, os resultados para a atividade antioxidante total foram menores do que para a extração dos compostos fenólicos totais, em termos de quantidade. Este fato foi observado pelos resultados das respostas de cada condição experimental avaliada, e que o aumento de quantidade de CFT não significa o aumento da AAT proporcionalmente. Para verificar a correlação entre as análises foi realizada a correlação de Pearson (r) entre CFT e AAT, representada na Figura 26.

Figura 26- CORRELAÇÃO DE PEARSON (R) ENTRE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL



FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

A correlação de *Pearson* (r) estima a linearidade entre duas variáveis. Os valores de correlação podem variar de 1 a -1, onde 1 significa uma forte correlação direta, e -1 representa uma forte correlação inversa. Para o presente estudo, o valor da correção de Pearson foi de 0,1099, muito próximo a 0, o que significa que as variáveis não podem ser correlacionadas.

A falta de correlação entre CFT e ATT pode ser resultado da interação de uma gama de fatores, como o estágio de maturação da fruta, genótipo, condições ambientais, sistema de plantio e fertilidade do solo, além dos fatores de quantificação destes compostos, como o método de extração, tamanho da amostra, tempo e tipo de armazenamento, além da escolha dos reagentes e a presença de interferentes na amostra, como gorduras, açúcares e ceras (VIDAL TALAMINI DO AMARANTE et al., 2008).

Tiveron et al. (2012) evidenciam ainda que a falta de correlação entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante pode ser explicada pela alta variedade de compostos fenólicos e não fenólicos que exercem atividade antioxidante, e que nem sempre a presença elevada dessa variedade de compostos resultará em uma maior atividade antioxidante do extrato. Como ocorre com os ácidos fenólicos, que com a substituição dos grupos hidroxila nas posições 3 e 5 por grupos metoxila, como no caso do ácido siríngico, reduz a atividade antioxidante. Dessa forma, tem-se um o

extrato com composição fenólica, mas não com equivalência em atividade antioxidante (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006).

Considerando que somente o modelo matemático para Compostos Fenólicos Totais foi validado, fez-se o uso dos resultados em termos de CFT para definição das melhores condições de extração, visto que representa maior confiabilidade. Além disso, também se levou em consideração os resultados obtidos a partir do perfil fenólico. Dessa forma, para esse estudo, estabeleceu-se como melhor condição o ensaio 21 do planejamento experimental (50°C, 40% de etanol, 4 g/L e 60% de ultrassom), que apresentou maior concentração em termo de CFT e em termos de perfil fenólico.

O extrato obtido a partir desse ensaio também teve sua atividade antioxidante avaliada pelo método FRAP, apresentando $516,21 \pm 17,08$ μM sulfato ferroso/g de biomassa.

4.2.3 Testes complementares para extração de compostos fenólicos

Visando a aplicabilidade da extração de compostos fenólicos a partir de resíduos industriais, buscou-se, a realização de uma extração que usasse uma maior razão sólido/líquido. Considerando os resultados obtidos nesse trabalho, sabe-se que menores razões sólido-líquido geram maiores concentrações de compostos fenólicos, possivelmente porque há diferença de gradiente para realizar a transferência de massa. Dessa forma, buscou-se uma estratégia de extração em duas etapas, empregando 20 g/L. A primeira etapa teve como objetivo retirar possíveis extrativos da biomassa, os quais, em tese, deixam o meio concentrado e não permitem a extração dos compostos fenólicos. E em seguida a segunda etapa com objetivo de obtenção de compostos fenólicos.

A primeira etapa de extração deu-se em condições, que de acordo com o modelo matemático desenvolvido para CFT, iria extrair menos compostos fenólicos (0 % etanol, 20°C e 20 % ultrassom). Já a segunda extração deu-se em condições que renderiam a maior concentração de compostos fenólicos (40 % etanol, 65°C e 100 % ultrassom).

Além de realizar a extração em duas etapas pelo método de ultrassom, também se realizou a extração pelo método Soxhlet. Os resultados obtidos para ambas as etapas em ambos os métodos de extração estão expressos na Tabela 15.

Tabela 15- RESULTADOS OBTIDOS PARA COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL E ÍNDICE PA

	Ultrassom		Sohtex	
	1º etapa	2º etapa	1º etapa	2º etapa
CFT	16,90 ±1,42	17,49 ±2,94	22,11±0,74	7,66±0,54
DPPH	70,61 ±5,68	31,64±4,38	86,68±0,38	81,86±8,71

*CFT expressos em miligrama de ácido gálico equivalente por grama de biomassa. **AAT expressa em micro mol de Trolox equivalente por grama de biomassa.

FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

Analisando os resultados conclui-se que a execução da extração em duas etapas não foi mais eficiente, quando comparadas com os resultados obtidos anteriormente no planejamento experimental. Mesmo considerando as duas etapas obteve-se um valor para CFT de 34,40 mg/g. O mesmo ocorreu para a extração com método de Soxhlet, o qual, ao considerar as duas etapas, resultou em 29,77 mg/g de CFT. Além disso, cada etapa de extração pelo método Soxhlet necessitou de mais de seis horas de ensaio, enquanto que pelo método de ultrassom o tempo de extração foi de uma hora.

4.2.4 Obtenção do extrato em maior volume

A partir da melhor condição definida para extração de compostos fenólicos, realizou-se várias extrações a fim de se obter um volume maior de extrato. A reação de extração ocorreu em uma escala maior da utilizada para realização da otimização do processo. Para obtenção dos extratos foram utilizados 300 mL de solução extratora (40% de etanol), na razão sólido/líquido de 4 g/L, 50°C, 60% de ultrassom, durante 60 minutos.

Os extratos obtidos foram submetidos a análise de CFT, apresentado um rendimento médio de 39,91±0,47 mgAG/g. O extrato também foi avaliado quanto à AAT, apresentando 55,09±6,32 µmol TE/g pelo método DPPH e 361,82±9,64 µM sulfato ferroso/g de biomassa pelo método FRAP.

Esse rendimento é menor do que o obtido nas mesmas condições no planejamento experimental, contudo, para esse ensaio ocorreu um aumento do volume de extração, o que pode ter causado a diferença obtida. É necessário

considerar ainda que não houve um aumento de escala do processo, levando em conta fatores como semelhança geométrica e dinâmica, o que pode explicar também a diferença dos resultados.

Em seguida, os extratos obtidos foram evaporados a fim de retirar o etanol contido nas amostras com o auxílio de um evaporador rotativo. O processo ocorreu até que obteve a redução de 40% da amostra inicial, o que corresponde ao volume de etanol adicionado na extração. Após removido o etanol, as amostras foram congeladas e em seguida, liofilizadas até restar apenas o material sólido, o qual foi armazenado protegido da luz.

Uma das amostras de extrato sólido, obtida a partir da extração de 300 mL, foi diluído com 10 mL de água destilada. A solução foi filtrada com filtro de nylon (0,45 μm) submetida a análise do perfil fenólico, os resultados estão expressos na tabela 16.

Tabela 16- PERFIL FENÓLICO OBTIDO POR HPLC-MS PARA O EXTRATO

	Ácido siríngico	Ácido gálico	Miricetina	Ácido p-cumárico	Quercetina
Extrato Liofilizado	6,042 \pm 0,355	0,228 \pm 0,008	0,041 \pm 0,002	0,035 \pm 0,001	0,221 \pm 0,022

Resultados expressos em mg/g_{biomassa}.

FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

Observa-se que, assim como para os resultados de CFT, houve uma diminuição nas concentrações dos compostos fenólicos em comparação com o ensaio 21 do planejamento experimental. É plausível considerar que as mesmas razões que levaram à redução dos valores de CFT possam ter influenciado a diminuição das concentrações dos compostos fenólicos. É possível que a alteração do volume do processo, sem levar em conta as questões de escalonamento, tenha resultado em uma extração menos eficiente, levando, assim, a uma redução dos valores de concentração tanto para CFT quanto para o perfil fenólico.

Assim como no planejamento experimental, o ácido siríngico apresenta-se em maior quantidade no extrato. O ácido siríngico é um composto fenólico da subfamília dimetoxibenzeno dos ácidos benzóicos (TEIXEIRA, 2014). Estudos demonstram que, como outros polifenóis, este composto apresenta efeitos anticancerígenos, afetando moléculas-alvo envolvidas no ciclo celular, atuando como

antioxidante, antiinflamatório, antiperoxidativo lipídico, antimitogênico e alterando a função do sistema imunológico (ADEYI et al., 2023).

Mihanfar et al. (2021) avaliaram os efeitos *in vitro* do ácido siríngico em células de câncer colorretal humano (SW-480) e o efeito do ácido siríngico administrado por via oral em modelos *in vivo* de câncer colorretal induzido em ratos. O tratamento com ácido siríngico resultou em uma inibição significativa dependente da dose da proliferação celular, indução de apoptose através do aumento dos níveis celulares de espécies reativas de oxigênio e danos ao DNA, bem como na regulação negativa dos principais genes proliferativos. *In vivo*, o tratamento de ratos com ácido siríngico demonstrou uma redução estatisticamente significativa do volume tumoral e da incidência quando comparado ao controle.

Zhang et al (2021) mostraram que a combinação de vitexina e ácido siríngico suprime a proliferação de células de câncer de mama. No estudo de Ramorobi et al. (2022) os autores reportaram que a complexação do ácido siríngico com sulfato de zinco resultou em uma interação sinérgica entre ambos. O resultado foi um complexo não citotóxico com potencial antioxidante e de controle glicêmico multimodo e melhorado.

Dessa forma, o extrato obtido, rico em ácido siríngico, se apresenta com potencial de aplicação vasto, devido as propriedades desse composto fenólico. Além do perfil fenólico, verificou-se também via HPLC a concentração de carboidratos presentes na amostra liofilizada. A análise de carboidratos foi realizada uma vez que, pode interferir na aplicação do extrato e, por se tratar do resíduo de uma fruta, suspeita-se que há presença de açúcares.

Na análise de carboidratos identificou-se na amostra $2,13 \pm 0,08$ g/L de xilose, $0,16 \pm 0,01$ g/L de glicerol e $1,04 \pm 0,04$ g/L de glicose. Esses carboidratos, uma vez recuperados, também apresentam potencial de aplicação.

4.2.5 Viabilidade dos extratos

4.2.5.1 Viabilidade celular

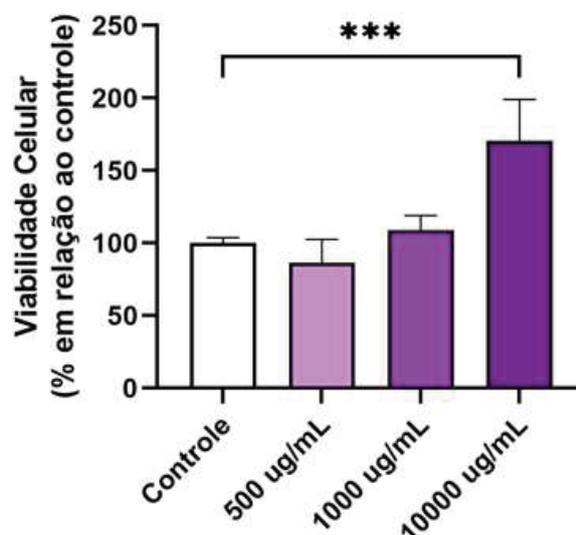
A análise de viabilidade celular em células saudáveis é importante pois permite avaliar a toxicidade e a segurança desses compostos. É uma etapa importante do desenvolvimento de terapias, uma vez que, permite avaliar a toxicidade de um

composto em células normais, o que ajuda a determinar a dose segura e eficaz a ser utilizada em estudos subsequentes. Além disso, testar compostos fenólicos em células saudáveis pode ajudar a identificar efeitos colaterais ou efeitos adversos que podem ocorrer em tecidos normais, o que é crucial para garantir a segurança e a eficácia desses compostos em suas aplicações posteriores (CHOUDHARI et al., 2020).

Na avaliação de viabilidade celular (Figura 27), a análise estatística dos resultados realizados com as células PBMCs expostas aos três níveis de concentração de extrato (500, 1000 e 10000 ug/mL), permite dizer que houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo em que as células foram expostas a concentrações de 10000 ug/mL do extrato.

O teste MTT permitiu avaliar a viabilidade celular das células expostas ao extrato do resíduo da produção de vinho, onde este não apresentou citotoxicidade nas concentrações testadas. Foi possível verificar que as concentrações de 500 e 1000 ug/mL se comportaram estatisticamente igual ao controle (condição ótima para as células), enquanto a concentração de 10.000 ug/mL apresentou um aumento de mais de 50 % na viabilidade celular. Isso sugere que a utilização desse antioxidante natural melhora as funções celulares do organismo.

Figura 27- VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS PBMCs EXPOSTAS A CRESCENTE CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO DO RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE VINHO EM 24 H.



***corresponde a diferença estatística com $\alpha=0,001$.

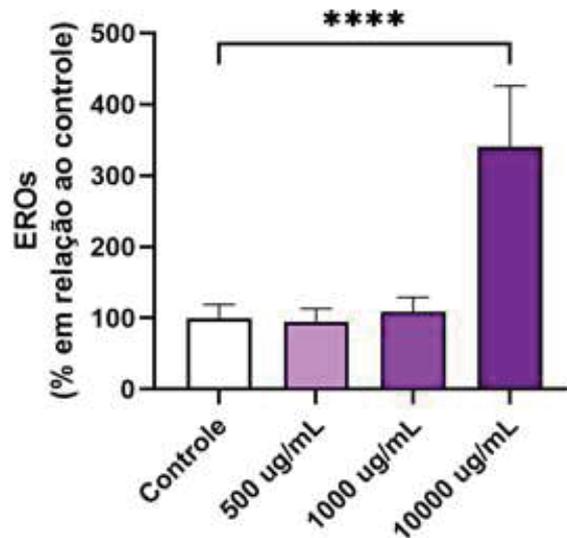
FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

4.2.5.2 Estresse oxidativo

No que se refere a avaliação do estresse oxidativo, a Figura 28 demonstra a concentração das espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células tratadas com diferentes concentrações do extrato durante 24h. Percebe-se que as concentrações de 500 e 1000 ug/mL se comportaram estatisticamente igual ao controle (condição ótima para as células). Já para a concentração de 10000 μ M o extrato do resíduo da produção de vinho aumentou significativamente os níveis de EROs.

Considerando que não houve perda celular, pode-se concluir que o extrato ajudou as células a suportar o estresse oxidativo, demonstrando o poder antioxidante do extrato do resíduo da produção de vinho.

Figura 28- CONCENTRAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) NAS CÉLULAS EXPOSTAS A CRESCENTE CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO DO RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE VINHO EM 24 H.

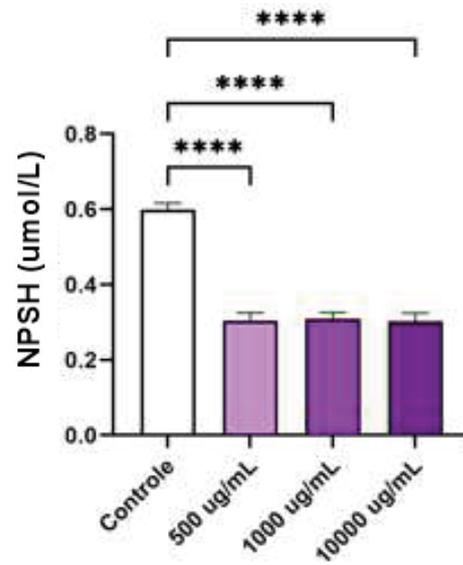


****corresponde a diferença estatística com $\alpha=0,0001$.

FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

Em relação às defesas antioxidantes, os níveis de NPSH (tíos não proteicos) diminuiram significativamente para todas as concentrações avaliadas, conforme pode ser visualizado na Figura 29. A diminuição da concentração de antioxidante, indica que os mesmos foram usados para neutralizar as espécies reativas e proteger as células do estresse oxidativo.

Figura 29- CONCENTRAÇÃO DE NPSH PARA AS DIFERENTES CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO DO RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE VINHO EM 24 H.



****corresponde à diferença estatística com $\alpha=0,0001$.

FONTE: Elaborado pelo autor, 2023.

5 CONCLUSÃO

O resíduo da produção de vinho pode ser uma fonte de compostos fenólicos que podem ser obtidos por meio de diferentes processos de extração. Neste trabalho, foi otimizado um método de extração por ultrassom, o qual foi obtido a partir da técnica de planejamento de experimentos. Também foi realizada a otimização do tempo de extração através de uma cinética de extração. A extração ideal deu-se nas condições de: 40 % de etanol, razão sólido/líquido de 4 g/L, 50 °C, 60 % de ultrassom, durante 60 minutos.

Para os resultados analisados (compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e índice PA) a variável razão sólido-líquido exerceu diferença significativa ($p < 0,05$). As demais variáveis (potência de ultrassom, temperatura e concentração de etanol) não apresentaram influência significativa.

Em relação aos métodos de extração, o método de ultrassom promoveu maior recuperação fenólica em menor tempo quando comparada com a extração pelo método Soxhlet.

O extrato do resíduo da produção de vinho demonstrou resultados positivos quanto sua viabilidade para aplicação em células humanas, demonstrando aumentar a viabilidade celular, bem com proteger as células do estresse oxidativo. Além disso, também demonstrou auxiliar as células a suportar o estresse oxidativo. Este trabalho sugere que o ácido siríngico seja o maior responsável pela atividade biológica do extrato. Contudo sugere-se avaliar o potencial dos compostos identificados individualmente.

6 TRABALHOS FUTUROS

Tendo em vista o potencial do resíduo da produção de vinho e dos compostos fenólicos obtidos nesse estudo, sugerem-se as seguintes etapas para complementar e avançar na pesquisa com esse resíduo.

- Entender quais compostos são extraídos do resíduo para diferentes métodos extrativos;
- Entender a capacidade de armazenamento do material, se há perda de compostos com o tempo;
- Entender a separação dos compostos entre si e demais substância do extrato, como os carboidratos;
- Realizar as análises de viabilidade celular e estresse oxidativo para cada composto químico padrão que foi quantificado por HPLC;
- Realizar as análises de viabilidade celular e estresse oxidativo com células não-saudáveis;
- Aplicar a condição otimizada de extração para as demais variedades da fruta;
- Realizar análises de atividade antioxidante por outros métodos;
- Entender o processo de extrator em larga escala, seus rendimentos e desafios;
- Determinar as limitações do processo, incluindo custo de extração, taxa de recuperação e porcentagem de pureza, estabilidade e toxicidade.

7 REFERÊNCIAS

ABARGHUEI, M. J.; ROUZBEHAN, Y.; ALIPOUR, D. The influence of the grape pomace on the ruminal parameters of sheep. *Livestock Science*, v. 132, p. 73–79, 2010.

ABE, L. T; DAMOTA, R. V; LAJOLO, F. M; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.27, n.2, p.394-400, 2007.

ADEYI, et al. Syringic acid demonstrates better anti-apoptotic, anti-inflammatory and antioxidative effects than ascorbic acid via maintenance of the endogenous antioxidants and downregulation of pro-inflammatory and apoptotic markers in DMN induced hepatotoxicity in rats. *Biochemistry and Biophysics Reports*, v. 33, Março 2023.

AGUILERA, J.M.; STANLEY, D.W. *Microstructural Principles of Food Processing and Engineering*, 2nd ed.; Springer US, 1999; ISBN 978-0-8342-1256-5

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 21, n. 2, p. 143-152, 2013.

AMARANTE, J.O.A. *Vinhos e vinícolas do Brasil*, Summus Editorial Ltda, São Paulo, 1986. 120 p.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 66, n. 1, p.1-9, 2007.

ARAÚJO, J. M. *Química de alimentos. Isoflavonóides. Teoria e prática*. 3ªed. Viçosa. Editora UFV. 2004. Cap. 14. p. 314-367.

ARRUDA, H. S. Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. *Food Chemistry*. v. 245. p.738-749. 2018.

AVERILLA, J. N. et al. Potential health benefits of phenolic compounds in grape processing by products. *Food Science and Biotechnology*, v. 28, n. 6, p. 1607–1615, 2019.

ASPÉ, E.; FERNÁNDEZ, K. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus rodiata* Bark. *Industrial Crops and Products*, v.34, p.838-844, 2011.

AZMIR, J., ZAIDUL, I. S. M., RAHMAN, M. M., SHARIF, K. M., MOHAMED, A., SAHENA, F., JAHURUL, M. A., GHAFOR, K., NORULAINI, N. A. N., OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, v. 117, p.426 – 36, 2013

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, v. 99, p. 191-203, 2006.

BARRALES, F. M. et al. Recovery of phenolic compounds from citrus by-products using pressurized liquids — An application to orange peel. *Food and Bioproducts Processing*, v. 112, p. 9–21, 2018.

BERES, C.; COSTA, G. N. S.; CABEZUDO, I.; SILVA, JAMES, N. K.; TELES, A. S. C.; CRUZ, A. P. G.; MELLINGER-SILVA, C.; TONON, R. V.; CABRAL, L. M. C.; FREITAS, S. P. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: a review. *Waste Management*. v. 68, p. 581-594, 2017.

BIESAGA, M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, n. 18, p. 2505-2512, 2011.

BOTELHO, V. et al. Potential for use of the residues of the wine industry in human nutrition and as agricultural input. In A. M. Jordão & F. Cosme (Eds.), *Grapes and wines: advances in production, processing, analysis and valorization* Rijeka: IntechOpen. 2017.

BRAGA, G. C., MELO, P. S., BERGAMASCHI, K. B., TIVERON, A. P., MASSARIOLI, A. P. Extraction yield, antioxidant activity and phenolics from grape, mango and peanut agro-industrial by-products. *Ciência Rural*. 2016:46(8):1498-1504.

BRENES, A.; VIVEROS, A.; CHAMORRO, S.; ARIJA, I. Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. *Animal Feed Science and Technology*, v. 211, p. 1-7, 2016.

BUCIĆ-KOJIĆ, A. et al. Enhancement of the anti-inflammatory properties of grape pomace treated by: *Trametes versicolor*. *Food and Function*, v. 11, n. 1, p. 680–688, 2020.

CABRITA, M. J.; RICARDO-DA-SILVA, J.; LAUREANO, O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. In: *I SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE VITIVINICULTURA*. Anais...Ensenada, México, 2003.

CARNIEL, N. et al. Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Acids and Flavonoids from *Physalis angulata*. *Journal of Food Process Engineering*, v. 40, n. 3, p. 1–11, 2017.

CHOJNACKA, K.; LEWANDOWSKA, U. Chemopreventive effects of polyphenol-rich extracts against cancer invasiveness and metastasis by inhibition of type IV collagenases expression and activity. *Journal of Functional Foods*, v. 46, n. January, p. 295–311, 2018.

CHOUDHARI, A. S., MANDAVE, P. C., DESHPANDE, M., RANJEKAR, P., & PRAKASH, O. (2020). *Phytochemicals in cancer treatment: From preclinical studies*

to clinical practice. *Frontiers in Pharmacology*, 10(January), 1–17.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01614>

CHOWDHARY, P. GUPTA, A., GNANSOUNOU, E. PANDEY, A., CHATURVEDI, P. Current trends and possibilities for exploitation of Grape pomace as a potential source for value addition *Environmental Pollution*, 278 (2021), 10.1016/j.envpol.2021.116796

COSTA, M. G.; BUCEK, E. U. *Enemp* 2017. v. d, p. 1–7, 2017

COVA, C. M., et al. Technology and Process Design for Phenols Recovery from Industrial Chicory (*Chicorium intybus*) Leftovers. *Molecules*, v. 24, n. 15, p. 2681, 2019.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v.12, n.4, p.564–582, 1999.

CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Comparison of the antioxidant activity of some acid phenols: structure-activity relationship. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, Benkyoku, v.59, p.324-325,1992.

da Rocha, C. B. e Noreña, C. P. Z. Extração Assistida por Microondas e Extração Assistida por Ultrassom de Compostos Bioativos do Bagaço de Uva *Jornal Internacional de Engenharia de Alimentos*, 16 (1–2) (2020)

DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D. PLE in the analysis of plant compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 37, n. 5, p. 1161–1165, 2004.

DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D.; OLSZOWY, M. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). *Food Chemistry*, v. 131, n. 3, p. 1037–1043, 2012.

DEL PINO-GARCÍA, R., RIVERO-PÉREZ, M. D., GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L., CROFT, K. D., e MUÑIZ, P. (2017). Antihypertensive and antioxidant effects of supplementation with red wine pomace in spontaneously hypertensive rats. *Food & Function*, 8(7), 2444-2454. <https://doi.org/10.1039/c7fo00390k>

DI DONNA, L., TAVERNA, D., INDELICATO, S., NAPOLI, A., SINDONA, G., MAZZOTTI, F., Rapid assay of resveratrol in red wine by paper spray tandem mass spectrometry and isotope dilution, *Food Chemistry*, v.229,p.354-357,2017.

DEL RIO, D. et al. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & redox signaling*, v. 18, n. 14, p. 1818–92, 2013.

DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay., *Food Chemistry* v. 125, n. 4, p. 1430-1435, 2011. ISSN 0308-8146.

DOSHI, P. et al. Phenolic compounds, antioxidant activity and insulinotropic effect of extracts prepared from grape (*Vitis vinifera* L) byproducts. *Journal of Food Science and Technology*, v. 52, n.1, p. 181–190, 2015.

ELLMAN G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1959 May;82(1):70–7.

EMBRAPA. Tecnologias para o Aproveitamento Integral dos Resíduos da Indústria Vitivinícola. Dezembro, 2018.

FERNANDES, A.; COSTA, M.; VASCONCELOS, C.; PINTADO, M. A compostagem de bagaço de uva com vista à obtenção de correctivos orgânicos e suportes de cultura de qualidade. *Actas Portuguesas de Horticultura*, v. 3, p. 297-303, 2005

FU-XIANG, L. et al. Comparison of phenolic profiles and antioxidant activities in skins and pulps of eleven grape cultivars (*Vitis vinifera* L.) *Journal of Integrative Agriculture* 2019, 18(5): 1148–1158.

GÓMEZ-PLAZA, E.; MIÑANO, A.; LÓPEZ-ROCA, J. M. Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. *Food Chemistry*, v. 97, n. 1, p. 87-94, 2006.

GONZÁLEZ-CENTENO M. R., et al., Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.) A response surface approach. *Ultrasonics sonochemistry*. 2014;21(6):2176-2184.
GONZÁLEZ-CENTENO, M. R. et al., Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: grape pomaces and stems. *LWT – Food Science and Technology*. [S.I.]. V. 43, n10, p. 1580-1586, 2010.

GOULA, A. M., THYMIATIS, K., KADERIDES, K. Valorization of grape pomace: Drying behavior and ultrasound extraction of phenolics *Food and Bioproducts Processing*, 100 (2016), pp. 132-144, 10.1016/j.fbp.2016.06.016

Grace Nirmala, J., Evangeline Celsia, S., Swaminathan, A., Narendhirakannan, R. T., & Chatterjee, S. (2018). Cytotoxicity and apoptotic cell death induced by *Vitis vinifera* peel and seed extracts in A431 skin cancer cells. *Cytotechnology*, 70(2), 537–554. <https://doi.org/10.1007/s10616-017-0125-0>

GRUZ, A. P., SILVA, C. G., TORRES, A. G., FREITAS, S. P., CABRAL, L. M. C. Recovery of bioactive compounds from grape pomace. *Rev. Bras. Frutic*. 2013;35:1147-1157.

GÜLÇİN, İ. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, v. 86, n. 3, p. 345-391, 2012.

HALEAGRAHARA, N; MIRANDA-HERNANDEZA, S; ALIM, M.A, , HAYESA, L; BIRDC, G , KETHEESAN, N. Therapeutic effect of quercetin in collagen-induced arthritis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 90, Issue null, p. 38-46, 2017.

HERNÁNDEZ, R. REBOLLEDO-LEIVA, H. FERNÁNDEZ-PURATICH, H. QUINTEROS LAMA, F. CATALDO, E. MUÑOZ, et al. Recovering apple agro-industrial waste for bioethanol and vinasse joint production: Screening the potential of chile Fermentation, 7 (4) (2021), 10.3390/fermentation7040203

HERRERA, M. C.; CASTRO, M. D. L. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. J. Chrom. A. 1100 (2005) 1–7.

ILYAS, T., CHOWDHARY, P., CHAURASIA, D., GNANSOUNOU, E., PANDEY, A., e CHATURVEDI, P. (2021). Sustainable green processing of grape pomace for the production of value-added products: An overview. In Environmental Technology and Innovation (Vol. 23). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101592>.

JIN, Q. et al. Techno economic analysis of a grape pomace biorefinery: Production of seed oil, polyphenols, and biochar Food and Bioproducts Processing, 127 (2021), pp. 139-151, 10.1016/j.fbp.2021.02.002

KASHYAP, D; SHARMA, A; TULI, H.S; SAK, K; PUNIA, S. MUKHERJEE.T, K. Kaempferol – A dietary anticancer molecule with multiple mechanisms of action: Recent trends and advancements. Journal of Functional Foods v.30, p. 203–219, 2017.

LAVELLI, V.; TORRI, L.; ZEPPA, G.; FIORI, L.; SPIGNO, G. Recovery od winemaking by-products for innovative food applications. Italian Journal of Food Science, v. 28, p. 542-564, 2016.

LIU, R.H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. J. Nutr., 134(12 Suppl): 3479S-3485S, 2004.

LLOBERA, A., CAÑELLAS, J. Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. Food Chem. 2007;101:659-666.

MACHADO, W. M., PEREIRA, A. D., MARCON, M. V. Effect of processing and storage on phenolic compounds present in fruits and vegetables. Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng., Ponta Grossa, 19 (1): 17-30, jan/jun. 2013. DOI: 10.5212/Publ.Exatas.v.19i1.0002

MAGRO, A.E.A.; CASTRO, R.J.S. Effects of solid-state fermentation and extraction solvents on the antioxidant properties of lentils. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 28, p. 101753, 2020.

MAJDA, M. H.; RAJAEIC, A.; BASHID, D.S.; MORTAZAVIF, S. A.; BOLOURIAN, S. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from bovine 107 pennyroyal (*Phlomischema parviflorum*) leaves using response surface methodology. Industrial Crops and Products, v.57, p.195–202, 2014.

MAKSIMOVIC, S.; IVANOVIC, J.; SKALA, D. Supercritical extraction of essential oil from *Mentha* and mathematical modelling- the influence of plant particle size. *Procedia Engineering*, v. 42, n. August, p. 1767–1777, 2012.

MANFREDINI, V.; MARTINS, V. D.; BENFATO, M.S.. Chá verde: benefícios para a saúde humana. *Revista Informa*, [S.l.], v. 16, n. 9-10, p. 68-70, 2004.

MANCA, M. L. et al. Oxidative Stress Skin Damages. *Industrial Crops & Products*, 2015.

Mazza, K. E. L. et al. Efeito das condições de processo na extração assistida por ultrassom de fenólicos do bagaço de uva. XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Out. 2016.

MESQUITA, A. K. F., et al. Estudo prospectivo tecnológico e científico do potencial anti-Schistosoma mansoni da cumarina e do ácido o-hidroxicinâmico. *Cadernos de Prospecção*. Salvador, vol.6, n.3, p.386-397, 2013.

MIHANFAR, A. et al. (2021). In vitro and in vivo anticancer effects of syringic acid on colorectal cancer: Possible mechanistic view. *Chemico-Biological Interactions*. 337. 109337. 10.1016/j.cbi.2020.109337.

MOKRANI, A.; MADANI, K. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Separation and Purification Technology*, v. 162, p. 68-76, 2016.

MORO, K. I. B. et al. Recovery of phenolic compounds from grape pomace (*Vitis vinifera* L.) by microwave hydrodiffusion and gravity. *LWT Food science and technology*. V.150, 2021.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983 Dec;65(1–2):55–63.

NOBRE, S. M; PEIXOTO, J. A. S; MONTEIRO, A. L. Síntese de trans-estilbenos substituídos via reação de Suzuki de brometos de vinila. *Sociedade Brasileira de Química (SBQ)*. 29a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2006.

NOUR, V.; TRANDAFIR, I.; COSMULESCU, S. Antioxidant capacity, phenolic compounds and minerals content of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves as influenced by harvesting date and extraction method. *Industrial Crops and Products*, v.53, p.133-139, 2014.

OIV- International Organisation of Vine and Wine. State of the world Vitivinicultural Sector in 2021. Abril, 2022.

OLIVEIRA, G. L.S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. *Rev. bras. plantas med.* 17 (1) Jan-Mar 2015.

PAULINO, M. et al. Toward the understanding of the molecular basis for the inhibition of COX-1 and COX-2 by phenolic compounds present in Uruguayan propolis and grape pomace. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 34, n. 12, p. 2643–2657, 2016.

PEREIRA, A. F. C. Potenciais alimentos funcionais com base em extratos de vinho de uva ou de videira. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas).2014. Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. Vol. 3, nº 4: p. 146-152. 2012. ISSN-2179-4804.

PENG, Y.; BISHOP, K. S.; QUEK, S. Y. Extraction optimization, antioxidant capacity and phenolic profiling of extracts from flesh, peel and whole fruit of New Zealand Grown Feijoa Cultivars. *Antioxidants*, v. 8, n. 5, p. 141, 2019.

PIYASENA, P.; MOHAREB, E.; MCKELLAR, R. C. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*, v.87, n.3, p.207-216, 2003.

RIVERA, P. et al. Recent trends on the valorization of winemaking industry wastes. In *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* (Vol. 27). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.100415>. 2021

RAMOROBI, et al. Zinc(II) – Syringic acid complexation synergistically exerts antioxidant action and modulates glucose uptake and utilization in L-6 myotubes and rat muscle tissue. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. v. 154. Outubro, 2022.

ROCHA, C. B. Extração de compostos bioativos do resíduo do processamento do suco de uva por micro-ondas e ultrassom e seu posterior encapsulamento. Instituto de ciência e tecnologia de alimentos, UFRGS, 2018.

ROCKENBACH, I. I., SILVA, G. L., RODRIGUES, E., KUSKOSKI, E. M., FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2008;28:23-44.

RODSAMRAN, P.; SOTHORNVIT, R. Extraction of phenolic compounds from lime peel waste using ultrasonic-assisted and microwave-assisted extractions. *Food Bioscience*, 2019. doi:10.1016/j.fbio.2019.01.017

ROESLER, R., et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. v. 27, p. 53–60. 2007.

ROGERO, S.O.; HIGA, O.Z.; SAIKI, M.; CORREA, O.V.; COSTA, I. Toxicology in *Vitro*, v. 14, n. 6, p. 497-504, 2000.

RUFINO, M. S. M. et al., Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). EMBRAPA. SSN 1679-6535, Fortaleza. Dez 2006.

SAKAKIBARA, H; HONDA, Y; NAKAGAWA, S; ASHIDA, H; KANAZAWA. Simultaneous Determination of All Polyphenols in Vegetables, Fruits, and Teas. Journal of Agricultural and Food Chemical., v.51, p. 571-581, 2003.

SANHUEZA, L. et al. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. PLoS ONE, v. 12, n. 2, p. 1–15, 2017.

SÃO JOSÉ, J. B.F.; ANDRADE, N.J.; RAMOS, A.M.; VANETTI, M.C.D.; STRINGHETA, P.C.; CHAVES, J. B.P. Decontamination by ultrasound application in fresh fruits and vegetables. Food Control, v. 45, p.36-50, 2014.

SHIRSATH, S. R.; SONAWANE, S. H.; GOGATE, P. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations - A review of current status. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, v. 53, p. 10–23, mar. 2012.

SILVA, G. V. Caracterização físico-química de cascas de uvas híbridas desidratadas obtidas por diferentes métodos. Universidade federal da Bahia. Programa de pós-graduação em ciência de alimentos. 2017.

SILVA, V. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of phenolic compounds extracted from wine industry by-products. Food Control, v. 92, p. 516–522, 2018.

SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, 2017, p. 848.

SIROHI, R. et al. Green processing and biotechnological potential of grape pomace: Current trends and opportunities for sustainable biorefinery. Bioresource Technology, INPRESS, 2020.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of Total Solids in Biomass. National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2005.

SUN, H.; GE, X.; LY, Y.; WANG A. Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed. Journal of Chromatography A, v.1237, p.1-23, 2012.

SUN, Y. et al. Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng by using response surface methodology. Separation and Purification Technology, New York, US, 78(3), 311-320, 2011.

SZYMANOWSKA, U; ZŁOTEK, U; KARAS, M; BARANIAK, B. Anti-inflammatory and antioxidative activity of anthocyanins from purple basil leaves induced by selected abiotic elicitors. Food Chemistry, v.172, p.71–77, 2015.