



Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Biociências

Departamento de Antibióticos

Programa de Pós Graduação em Biotecnologia – RENORBIO



**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE
RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DE UVA CV. ISABEL (Vitis labrusca L.) E
MAGNA (BRS MAGNA) DO VALE DO SÃO FRANCISCO, PETROLINA -
PE.**

ERIKA DE ARRUDA NASCIMENTO

Recife

2021

ERIKA DE ARRUDA NASCIMENTO

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE
RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DE UVA CV. ISABEL (*Vitis labrusca* L.) E
MAGNA (BRS MAGNA) DO VALE DO SÃO FRANCISCO, PETROLINA - PE.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do Grau de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em recursos naturais

ORIENTADOR/A: Prof^a. Dr^a. Jaciana dos Santos Aguiar.

CO-ORIENTADOR/A: Prof^a. Dr^a. Vera Lúcia Arroxelas Galvão de Lima.

Recife

2021

Catálogo na Fonte:
Elaine C Barroso, CRB-4/1728

Nascimento, Érika de Arruda

Atividade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica de resíduo agroindustrial de uva cv. Isabel (*Vitis labrusca* L.) e Magna (BRS Magna) do Vale do São Francisco, Petrolina-PE / Érika de Arruda Nascimento – 2021.

122 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Jaciana dos Santos Aguiar

Coorientadora: Vera Lúcia Arroxelas Galvão de Lima

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Recife, 2021.

Inclui referências.

1. Uva- cultivo 2. Plantas- compostos bioativos 3. Petrolina (PE)I. Aguiar, Jaciana dos Santos (orient.) II. Lima, Vera Lúcia Arroxelas Galvão de (coorient.) III. Título

634.8

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2022-016



Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Biociências

Departamento de Antibióticos



Programa de Pós Graduação em Biotecnologia – RENORBIO

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE
RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DE UVA CV. ISABEL (Vitis labrusca L.) E
MAGNA (BRS MAGNA) DO VALE DO SÃO FRANCISCO, PETROLINA - PE.**

Por: Erika de Arruda Nascimento

Data de aprovação: 23/12/2021

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida – Membro Interno

Universidade Federal do Vale do São Francisco

Profa Dra. Maria Tereza dos Santos Correia – Membro Interno

Universidade Federal de Pernambuco

Profa Dra. Andréa Lopes Bandeira Delmiro Santana – Membro Externo

Universidade Federal de Pernambuco

Profa Dra. Norma Buarque de Gusmão – Membro Externo

Universidade Federal de Pernambuco

Profa Dra. Jaciana dos Santos Aguiar – Membro Interno

Universidade Federal de Pernambuco

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Marconiedson e Edineide, e ao meu irmão, Marconi Júnior, alicerces de toda uma vida, peças fundamentais na construção do que hoje sou.

E ao meu esposo, Cleber, por me ensinar a buscar sempre mais, por acreditar em mim, por todo o incentivo e amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, ao Divino Mestre Jesus e à Espiritualidade maior, forças vitais do universo, por toda a energia e luz a mim dispensadas e confiadas nos momentos de dificuldades, e por sempre me guiarem em todos os meus passos, e ao longo deste trabalho;

Aos meus pais, Marconiedson e Edineide, por todo amor e pelos valores que me repassaram, com seus grandiosos ensinamentos, e que ambos até hoje contribuem, às suas possíveis maneiras, para me fortalecer e motivar a seguir em frente na busca pelo meu desenvolvimento;

Ao meu irmão, Marconi Júnior, por ter sido minha fonte de inspiração para os estudos quando criança, e por ser o meu grande amigo, fiel escudeiro, com quem sei que sempre posso contar;

Ao meu esposo, Cleber, por todo o amor, incentivo e dedicação a mim ofertados, pelas atividades, horas e dias disponibilizados para o benefício desta pesquisa, por todo apoio e comprometimento. Com ele, aprendi a acreditar mais em mim, a perseverar diante das dificuldades, e descobri que nenhum obstáculo é tão grande quando existe a vontade de vencer;

À minha orientadora, Prof^a Jaciana Aguiar, por ter acreditado em mim antes mesmo de me conhecer, e por nunca se ausentar diante de quaisquer dificuldades que surgiram ao longo deste caminho, sempre com um sorriso no rosto e com uma mão amiga estendida. Agradeço por transmitir muito além do conhecimento, por demonstrar que educar é também comprometer-se no alcance dos sonhos de outro alguém, e fazê-los nossos também;

À minha co-orientadora, Prof^a Vera Arroxelas, por toda ajuda no desenvolvimento do trabalho, e por ter aceitado colaborar novamente na minha trajetória acadêmica. Agradeço por seus ensinamentos desde o mestrado, por todas as sementes plantadas, que foram muito além da pesquisa, e que serviram de espelho e me motivaram ainda mais quanto ao desejo de ser uma professora;

Aos Prof^{es} Jackson Almeida, Maria Tereza Correia, Andréa Santana e Amanda Sena, por terem aceitado o convite a fazer parte da banca examinadora deste trabalho, e por suas generosas e enriquecedoras contribuições;

A todos os colegas do Laboratório de Cultura de Células, por todo companheirismo e ajuda ao longo deste trabalho. Cada um, a seu modo, colaborou de alguma maneira para que os meus objetivos fossem atingidos, seja na prática diária, por um ensinamento ou por dividir comigo a sua companhia, tornando os dias mais leves;

À Erwely Barros, técnica do laboratório de Laboratório de Cultura de Células (Danti/UFPE), por tudo que fez por mim ao longo desta pesquisa. Além de uma grande amiga que ganhei neste período, um ser humano ímpar, que embora tenha muito conhecimento sobre o que faz, se destaca por sua alegria contagiante e por estar sempre disposta a ajudar, com empenho e dedicação, se tornando uma peça fundamental na vida de todos nós;

Ao grupo Timbaúba S/A, produtor dos sucos de uva integral OQ[®], por disponibilizar o resíduo agroindustrial de uva cv. Isabel e Magna, principais materiais de estudo desta pesquisa, contribuição esta de grande importância para a concretização deste trabalho;

Às Universidades Federal e Federal Rural de Pernambuco, pela infraestrutura que tive a minha disposição, tornando possível realização dos experimentos necessários a minha pesquisa, assim como todos os professores e funcionários que compõem o Programa de Pós Graduação em Biotecnologia (RENORBIO);

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo a mim disponibilizada.

*“Não perca o resto do tempo que ainda te resta,
não perca tempo pensando que a vida não presta...
Certas canções duram pouco, outras são eternas,
por que carros e aviões, se tens sonhos e pernas?”*

- Vander Lee

RESUMO (PORTUGUÊS)

O processamento de uvas e derivados geram quantidade elevada de resíduos ricos em compostos bioativos. Dentre os fitoquímicos presentes nos resíduos de uva podemos destacar as antocianinas, associadas a benefícios à saúde, como propriedades antioxidante, antimicrobiana e anticâncer. O objetivo deste trabalho foi investigar as atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica do resíduo de uva Isabel (*Vitis labrusca* L.) e Magna (BRS Magna). O resíduo foi cedido por uma unidade processadora de suco de uva integral, do Vale do São Francisco, Petrolina-PE. Extratos antociânicos em fase aquosa e antocianinas purificadas foram utilizados na determinação das atividades investigadas. Análises cromatográficas identificaram 8 tipos de antocianinas, em teores entre 0,7 a 148 mg/L nos extratos, e de 0,48 a 108 mg/L nas antocianinas purificadas, e a malvidina-3-5-di-O-diglicosídeo foi a antocianina majoritária. Para a atividade antioxidante, foram encontrados para os extratos de resíduos úmidos e secos de uva Isabel teores entre 63 e 153 µg EQ Trolox/ mL frente ao DPPH e ABTS, de 120 e 220 µg EQ AA/ mL para a Capacidade Antioxidante Total - CAT, 36 e 139 µg EQ AG/ mL para o Poder Redutor -PR, respectivamente; e para os de resíduos de uva Magna úmidos e secos, teores entre 41 e 174 µg EQ Trolox/ mL frente ao DPPH e ABTS, 180 e 360 µg EQ AA/ mL para a CAT, 42 e 115 µg EQ AG/ mL para o PR, respectivamente. Para antocianinas purificadas a partir dos resíduos úmidos e secos de uva Isabel, os teores foram entre 14.670 e 48.440 mg EQ Trolox/ mL frente ao DPPH e ABTS, 50.730 e 69.060 mg EQ AA/ mL para a CAT, e 4.880 e 6.500 mg EQ AG/ mL para o PR, respectivamente; e para as de resíduos úmidos e secos de uva Magna, teores entre 16.360 e 44.410 mg EQ Trolox/ mL frente ao DPPH e ABTS, 61.860 e 72.330 mg EQ AA/ mL para a CAT, e 3.720 e 5.930 mg EQ AG/ mL para o PR, respectivamente. Quanto a atividade antimicrobiana, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os extratos e as antocianinas purificadas de resíduos de uva Isabel e Magna (seco e úmido) foi de 3 e 4 mg/mL frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes*. Na atividade citotóxica, nenhum dos extratos e antocianinas purificadas exibiram alta atividade citotóxica (CI % entre 75 - 100 %) frente linhagens não-cancerígenas testadas (L929 e Vero) enquanto que para a linhagem cancerígena HeLa, todas antocianinas purificadas demonstraram atividade moderada ou alta (CI% acima de 50%), assim como o extrato de resíduo de uva Isabel seco, que apresentou CI% de 65,38%. Antocianinas purificadas de resíduo úmido de uva Isabel apresentaram CI_{50} de 74,4 e 136,2 µg/mL, para as linhagens HeLa e Vero, respectivamente. Esta pesquisa pretende contribuir para a promoção do potencial biotecnológico do resíduo de uva, contribuindo para o desenvolvimento de novos produtos funcionais nas indústrias de fitoterápicos, alimentos e cosméticos, implicando também no desenvolvimento econômico e na redução de danos ao no meio ambiente.

Palavras-chaves: compostos bioativos; flavonoides; atividades biológicas.

ABSTRACT

The processing of grapes and derivatives generate a high amount of residues rich in bioactive compounds. Among the phytochemicals present in grape residues, we can highlight anthocyanins, associated with health benefits, such as antioxidant, antimicrobial and anticancer properties. The objective of this work was to investigate the antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of Isabel (*Vitis labrusca* L.) and Magna (BRS Magna) grape residue. The residue was donated by a whole grape juice processing unit, in Vale do São Francisco, Petrolina-PE. Anthocyanin extracts in aqueous phase and purified anthocyanins were used to determine the activities investigated. Chromatographic analyzes identified 8 types of anthocyanins, at levels between 0.7 and 148 mg/L in the extracts, and from 0.48 to 108 mg/L in the purified anthocyanins, and malvidin-3-5-di-O-diglycoside was the major anthocyanin. For the antioxidant activity, contents between 63 and 153 µg EQ Trolox/ mL were found for the extracts of wet and dry residues of Isabel grapes compared to DPPH and ABTS, and 120 and 220 µg EQ AA/ mL for the Total Antioxidant Capacity - CAT, 36 and 139 µg EQ AG/mL for Reducing Power -PR, respectively; and for wet and dry Magna grape residues, levels between 41 and 174 µg EQ Trolox/ mL against DPPH and ABTS, 180 and 360 µg EQ AA/ mL for CAT, 42 and 115 µg EQ AG/ mL for PR, respectively. For anthocyanins purified from the wet and dry residues of Isabel grapes, the contents were between 14,670 and 48,440 mg EQ Trolox/mL against DPPH and ABTS, 50,730 and 69,060 mg EQ AA/mL for CAT, and 4,880 and 6,500 mg EQ AG/mL for PR, respectively; and for the wet and dry residues of Magna grapes, levels between 16,360 and 44,410 mg EQ Trolox/ mL compared to DPPH and ABTS, 61,860 and 72,330 mg EQ AA/ mL for CAT, and 3,720 and 5,930 mg EQ AG/ mL for the PR, respectively. As for antimicrobial activity, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for extracts and anthocyanins purified from Isabel and Magna grape residues (dry and wet) was 3 and 4 mg/mL against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* and *Listeria monocytogenes*. In terms of cytotoxic activity, none of the extracts and purified anthocyanins exhibited high cytotoxic activity (CI % between 75 - 100 %) against non-cancerous tested strains (L929 and Vero) while for the HeLa cancer strain, all purified anthocyanins showed moderate or high activity. (CI% above 50%), as well as the dry Isabel grape residue extract, which presented a CI% of 65.38%. Anthocyanins purified from the wet residue of Isabel grapes presented IC50 of 74.4 and 136.2 µg/mL, for the HeLa and Vero strains, respectively. This research aims to contribute to the promotion of the biotechnological potential of grape residue, contributing to the development of new functional products in the herbal, food and cosmetics industries, also implying in economic development and in reducing damage to the environment.

Keywords: bioactive compounds; flavonoids; biological activities.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Objetivos do Desenvolvimento Sustentável	26
Figura 2 - Classificação dos compostos fenólicos antioxidantes	31
Figura 3 - Compostos fenólicos majoritários presentes no resíduo de uva	32
Figura 4 - Estrutura química de um flavonoide.....	33
Figura 5 - Estrutura básica das antocianinas	36
Figura 6 - Principais tipos de antocianidinas encontradas em plantas	37
Figura 7 - Fluxograma da produção do suco integral de uva	45
Figura 8 - Cromatograma das antocianinas (soluções padrão) e seus respectivos tempos de retenção (TR).....	50
Figura 9 - Estrutura bidimensional das antocianinas majoritárias quantificadas em extratos antociânicos em fase aquosa e em antocianinas purificadas a partir de resíduo de suco integral de uvas Isabel e Magna através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)	63
Figura 10 - Cromatogramas (CLAE- DAD, 520 nm) dos extratos antociânicos em fase aquosa obtidos a partir dos resíduos (casca e semente) do processamento de suco integral de uva cv. Isabel e Magna	65
Figura 11 - Cromatogramas (CLAE- DAD, 520 nm) das antocianinas purificadas obtidas a partir dos resíduos (casca e semente) do processamento de suco integral de uva cv. Isabel e Magna.....	67
Figura 12 - Espectro de massa (modo negativo) dos extratos antociânicos em fase aquosa obtidos a partir dos resíduos (casca e semente) do processamento de suco integral de uva cv. Isabel e Magna <i>via</i> QToF- MS.	72
Figura 13 - Espectro de massa (modo positivo) dos extratos antociânicos em fase aquosa obtidos a partir dos resíduos (casca e semente) do processamento de suco integral de uva cv. Isabel e Magna <i>via</i> QToF- MS	73

Figura 14 - Estruturas bidimensionais dos compostos encontrados nos extratos antociânicos em fase aquosa obtidos a partir dos resíduos (casca e semente) do processamento de suco integral de uva cv. Isabel e Magna via QToF-MS 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração das soluções-estoque e intermediária das antocianinas em estudo.....	48
Tabela 2 - Distribuição das soluções nas colunas 1 e 2 para extratos antociânicos aquosos e antocianinas purificadas na concentração mãe de 10mg/ML.....	53
Tabela 3 - Teor de antocianinas totais presentes nos extratos antociânicos aquosos de resíduo úmido e seco de uva cv. Isabel e cv. Magna.....	57
Tabela 4 - Perfil de antocianinas majoritárias quantificadas em extratos antociânicos em fase aquosa de resíduo de suco integral de uvas Isabel e Magna através de CLAE-DAD.....	61
Tabela 5 - Perfil de antocianinas majoritárias quantificadas em antocianinas purificadas a partir de resíduo de suco integral de uvas Isabel e Magna através de CLAE-DAD.....	62
Tabela 6 - Dados qualitativos dos compostos identificados nos extratos antociânicos em fase aquosa obtidos a partir dos resíduos (casca e semente) do processamento de suco integral de uva cv. Isabel e Magna via QToF-MS.....	74
Tabela 7 - Atividade antioxidante dos extratos antociânicos aquosos (EAA) de resíduo úmido e seco de uva cv. Isabel e cv. Magna, determinada pela capacidade de sequestro dos radicais DPPH [•] e ABTS ^{•+} , Capacidade Antioxidante Total (CAT) e Poder Redutor (PR).....	82
Tabela 8 - Atividade antioxidante das antocianinas purificadas (ACIP) de resíduo úmido e seco de uva cv. Isabel e cv. Magna, determinada pela capacidade de sequestro dos radicais DPPH [•] e ABTS ^{•+} , Capacidade Antioxidante Total (CAT) e Poder Redutor (PR).....	87
Tabela 9 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos antociânicos aquosos obtidos a partir de resíduos de uva cv. Isabel e Magna....	91

Tabela 10 - Percentual de inibição do crescimento de <i>S. aureus</i> dos extratos antociânicos aquosos obtidos a partir de resíduos de uva cv. Isabel e Magna.....	93
Tabela 11 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) das antocianinas purificadas (ACYP) obtidas a partir de resíduos de uva cv. Isabel e Magna.....	94
Tabela 12 - Percentual de inibição do crescimento celular (CI %) dos extratos antociânicos aquosos (300 µg/ml) obtidos a partir de resíduos de uva cv. Isabel e Magna em linhagens celulares cancerígenas e não cancerígenas (72 h de incubação)	97
Tabela 13 - Percentual de inibição do crescimento celular (CI %) das antocianinas purificadas (ACIP, 200 µg/ml) obtidas a partir de resíduos de uva cv. Isabel e Magna em linhagens celulares cancerígenas e não cancerígenas (72 h de incubação)	99
Tabela 14 - Valores de CI ₅₀ (µg/mL) e intervalo de confiança (CI 95%) dos extratos antociânicos aquosos e antocianinas purificadas obtidos a partir de resíduos de uva cv. Isabel e Magna em linhagens celulares cancerígenas e não cancerígenas (72 h de incubação).....	101

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Objetivos gerais	19
1.2 Objetivos específicos	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Produção e processamento de uvas	20
2.2 Resíduos agroindustriais	23
2.2.1 Utilização de resíduos agroindustriais e o desenvolvimento sustentável	24
2.2.2 Resíduos agroindustriais de uva	28
2.3 Compostos bioativos presentes no resíduo agroindustrial de uva	30
2.3.1 Compostos fenólicos	30
2.3.2 Antocianinas	34
2.4 Potencial antioxidante dos resíduos agroindustriais de uva	38
2.5 Potencial antimicrobiano dos resíduos agroindustriais de uva	40
2.6 Potencial anticâncer dos resíduos agroindustriais de uva	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 Obtenção das amostras	45
3.2 Extração e purificação das antocianinas	46
3.3 Determinação das antocianinas totais	47
3.4 Identificação e quantificação das antocianinas	47
3.4.1 Análises cromatográficas	47
3.4.2 Análises espectrométricas.....	50
3.5 Determinação da atividade antioxidante	51
3.5.1 Sequestro do radical DPPH•	51
3.5.2 Sequestro do radical ABTS•+	51
3.5.3 Capacidade antioxidante total (CAT)	51
3.5.4 Poder Redutor (PR)	52

3.6 Atividade antimicrobiana	52
3.6.1.Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) – Técnica da microdiluição	52
3.6.2. Percentual de inibição microbiana dos extratos antociânicos aquosos ..	54
3.7 Atividade citotóxica	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 Determinação das antocianinas totais (AT)	57
4.2 Identificação e quantificação das antocianinas	60
4.2.1 Identificação e quantificação das antocianinas – CLAE – DAD.....	60
4.2.2 Análises espectrométricas.....	71
4.3 Determinação da atividade antioxidante	81
4.4 Atividade antimicrobiana	90
4.5 Atividade citotóxica	95
5 CONCLUSÃO	104
REFERÊNCIAS	105

1. INTRODUÇÃO

Com o crescimento da demanda por novas fontes naturais de aditivos a serem utilizados na indústria, em especial a de alimentos, devido a conscientização cada vez maior dos consumidores acerca da importância da alimentação saudável, este setor tem procurado por alternativas que sejam, além de seguras, também benéficas à saúde humana (SILVA *et al.*, 2017).

No que tange à alimentação, de forma geral, observa-se uma tendência de consumo mais consciente, voltada à promoção e manutenção da saúde a partir de um estilo de vida que valoriza não apenas uma dieta rica em alimentos ricos em nutrientes e seguros, mas que também sejam compostos por ingredientes naturais, livres de aditivos químicos e funcionais (HELKAR, SAHOO E PATIL, 2016).

Atualmente, as doenças cardiovasculares, diabetes e câncer estão entre as doenças que mais causam mortes, a nível mundial, e o consumo de alimentos considerados funcionais, como frutas e hortaliças ricas em fibras, fenólicos e flavonoides, podem ajudar no enfrentamento a tais enfermidades. E neste sentido, os resíduos advindos desses alimentos também podem ser utilizados para obter compostos e ingredientes com caráter funcional (HELKAR, SAHOO E PATIL, 2016).

Em consonância a este cenário, os fitoquímicos bioativos podem ser explorados e dentre eles podemos destacar as antocianinas, pois são consideradas seguras quanto à ingestão, visto que estão presentes em diversas frutas e hortaliças como, por exemplo, uvas, romã, frutas vermelhas, cenoura preta, entre outras (SILVA *et al.*, 2017c).

Pertencente ao grupo dos flavonoides, as antocianinas têm sido associadas à diferentes benefícios a saúde humana, por apresentarem atividade anti-inflamatória, anticâncer, antioxidante, antibacteriana, antiobesidade, além de atuar na prevenção da diabetes e de problemas na visão e no sistema nervoso (MA *et al.*, 2019; KHOO *et al.*, 2017).

Dentre as frutas e hortaliças ricas em antocianinas, podemos destacar as uvas e seus derivados, que tem os fitoquímicos bioativos presentes em sua composição correlacionados à prevenção de diversas fisiopatologias, como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (SALEHI, *et al.*, 2019).

No entanto, anualmente, no processamento de uvas e derivados, elevada quantidade de resíduos são produzidos, o que conduz a busca por novas formas viáveis, do ponto de vista econômico, de reaproveitamento destes subprodutos, o que por sua vez também contribui para mitigar os impactos ambientais causados pelo desperdício desta matéria-prima além de possibilitar o desenvolvimento de novos produtos com amplo potencial (CIRQUEIRA *et al.*, 2017).

Aguilar *et al.* (2018) ressaltam que, embora este fruto exiba teor de fenólicos significativamente alto, uma boa parcela destes compostos fica nos subprodutos gerados pós-processamento, com quantidades que variam de acordo com as condições agroclimáticas e de recuperação aplicadas.

De acordo com Bordiga *et al.* (2019), os extratos (líquido, concentrado ou em pó) obtidos a partir do bagaço de uva apresentam possibilidades de aplicações diversas na indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi investigar o perfil fitoquímico e as atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica do resíduo de uva cv. Isabel (*Vitis labrusca* L.) e cv. Magna (BRS Magna).

1.1. Objetivo Geral

Investigar o perfil fitoquímico e as atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica dos resíduos agroindustrial de uva cv. Isabel (*Vitis labrusca* L.) e cv. Magna (BRS Magna).

1.2. Objetivos específicos

- Coletar o resíduo agroindustrial de uva cv. Isabel e cv. Magna em uma indústria de produção de suco integral;
- Obter o extrato aquoso e de antocianinas purificadas, a partir de resíduos úmidos e secos;
- Determinar o teor de antocianinas monoméricas totais dos extratos aquosos antociânicos;
- Identificar e quantificar as antocianinas do extrato aquoso e das antocianinas purificadas;
- Avaliar a capacidade antioxidante do extrato aquoso e das antocianinas purificadas;
- Investigar a atividade antimicrobiana do extrato aquoso e das antocianinas purificadas;
- Determinar o efeito citotóxico do extrato aquoso e das antocianinas purificadas em linhagens de células tumorais e não-tumorais humanas

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção e processamento de uvas

As uvas podem ser divididas em 3 principais variedades: a Europeia (*Vitis vinífera* L.), Americana (*Vitis labrusca* e *Vitis rotundifolia*) e a Híbrida francesa. Este fruto ainda pode ser classificado quanto: a sua utilização, onde temos as uvas destinadas a produção de vinho, as de mesa e as passas (desidratadas); e a presença ou ausência de sementes (CIRQUEIRA et al., 2017).

Vitis vinifera é um tipo de árvore frutífera mundialmente cultivada, e os vinhos advindos de seus frutos apresentam conteúdos diversificados de compostos fenólicos, entre eles os ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos e flavonoides (SALEHI, et al., 2019). No que diz respeito as uvas vitiviníferas, sua composição fenólica está intimamente relacionada a parte do fruto analisada, visto que estes compostos podem ser encontrados tanto na polpa como na casca e sementes, e ainda nas folhas e raiz da planta (SALEHI, et al., 2019).

Segundo Trošt et al. (2016), as uvas *V. vinifera* L. são mais utilizadas na produção de vinhos, porém este processo extrai parcialmente os compostos fenólicos presentes na fruta, o que resulta em um bagaço residual (constituído por casca e sementes) rico em fitoquímicos bioativos, que é comumente descartado por este setor industrial.

Em contrapartida, as uvas americanas da espécie *V. Labrusca* tem seu plantio altamente difundido no Brasil e são destinadas, em sua maioria, para a produção de suco de uva, bebida com valor nutricional e sabores relevantes, que tem crescido mundialmente quanto ao seu consumo (TOALDO et al., 2013). Estas cultivares também são utilizadas na produção de outros derivados de uva, tais como vinhos de mesa, vinagre, compotas e doces, e correspondem mais de 80% das uvas processadas no país (TOALDO et al., 2013).

A produção mundial anual de uvas pode se aproximar a quase 70 milhões de toneladas, onde cerca de 80% é destinado para a produção de vinho, e cerca de 20% deste fruto processado permanece como bagaço, sendo que este apresenta quantidades elevadas de compostos fenólicos, que reduzem seu pH

e aumentam a resistência à degradação biológica, podendo causar danos ambientais (KALLI *et al.*, 2018).

A produção de uvas brasileiras foi de 1.445.705 toneladas em 2019, e neste mesmo ano a região Nordeste representou 13,85% da área vitícola nacional, com viticultura concentrada no Vale do São Francisco (Pernambuco e Bahia), e produziu até 2,5 safras por ano, na mesma área. Esta região, segunda maior em produção de uva em 2019, contribuiu com 34,46% da produção nacional, e em Pernambuco, a produção foi de 420.830 toneladas de uvas (maior do Nordeste e segunda maior do Brasil), sendo atualmente a principal região produtora de uvas de mesa do país (MELLO E MACHADO, 2019).

A produção nacional de uvas destinadas ao processamento (vinho, suco e derivados) foi estimada em 698.045 toneladas em 2019. E o setor vitivinícola considerando o enoturismo e os produtos nacionais e os importados movimentou R\$ 26,47 bilhões. No que diz respeito ao segmento de vinhos e sucos nacionais, o valor estimado foi de R\$ 9,25 bilhões (MELLO E MACHADO, 2019). Ademais, o mercado brasileiro tem demonstrado tendência de crescimento expressivo da demanda por suco de uva natural e integral pronto para o consumo (COSTA, 2019).

Dentre as uvas cultivadas no Brasil, podemos citar as uvas Isabel e Magna, que tem sido plantadas principalmente no Sul e Nordeste brasileiro. A uva Isabel (*Vitis labrusca*) que é o tipo deste fruto mais cultivado no país, tem sua origem no sul dos Estados Unidos, e passou a despertar o interesse do mercado de vinhos europeus a partir de 1850, devido à resistência a pragas, como o oídio, vindo depois a tornar-se uma das principais cultivares da espécie (SILVA *et al.*, 2017c; RIZZON, MIELE e MENEGUZZO, 2000).

Segundo Bender *et al.* (2020), a uva Isabel é a principal matéria-prima utilizada para a produção de suco de uva integral (um derivado sem álcool, com sabor cor e aroma bem característicos do fruto de origem) no Brasil, devido a sua alta disponibilidade.

Esta cultivar exibe bom potencial no que diz respeito a produção de açúcar, e cachos pequenos, que se encontram soltos e com poucas bagas porém de tamanho robusto, além de ser considerada uma planta bastante fértil

e que apresenta alta produtividade (KOYAMA *et al.*, 2014; SATO *et al.*, 2009; RIZZON, MIELE e MENEGUZZO, 2000).

A uva Magna (BRS Magna) foi criada em 1999, resultante do cruzamento pelo método de reprodução clássica (com seleção das populações F1) entre a "BRS Rúbea" e 'IAC 1398-21' ('Traviú'), na Embrapa Uva e Vinho (Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brasil), exibindo ciclo intermediário e larga adaptação climática, apresentando-se como uma alternativa para aprimorar os atributos do suco de uva brasileiro, como cor, a doçura e o sabor (RITSCHER *et al.*, 2014).

A uva Magna (BRS Magna) foi desenvolvida pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), que tem seu uso destinado principalmente para o processamento de suco, em especial no Vale do São Francisco, no nordeste brasileiro (SILVA *et al.*, 2020).

De acordo com Ritschel *et al.* (2014), a uva "BRS Magna" apresenta a possibilidade de dois ciclos produtivos por ano, em condições tropicais, exibindo extensa adaptação climática, que permite seu cultivo em clima temperado e tropical úmido, além de oferecer perfil bioquímico interessante, como teor de açúcar de 17 a 19°Brix, e níveis significantes de antocianinas e polifenóis totais.

Ainda segundo os autores supracitados, a "BRS Magna" exibe agradável sabor de framboesa e intensa cor roxa, sendo recomendada para fazer suco de uva varietal ou aqueles em que seja misturada com outras uvas, visando melhorias em suas características sensoriais.

Segundo Silva *et al.* (2020), ainda são escassas as informações acerca da cv. Magna e seus subprodutos, no entanto podem ser considerados objetos de estudos científicos, seja no desenvolvimento e elaboração de produtos alimentícios bem como um potencial ingrediente, visando principalmente os seus compostos bioativos. Ainda de acordo com estes autores, o resíduo de uva cv. Magna, composto por cascas do fruto, exibe teor significativamente alto de fitoquímicos bioativos, além de atividade antioxidante.

As antocianinas, pigmentos presentes em quantidades relevantes nas uvas escuras, como as dos tipos acima mencionadas, pertencem ao grupo dos flavonoides, compostos que possuem forte ação antioxidante, são quelantes de

metais, além de atuar como sequestradores de radicais livres (KALLI *et al.*, 2018).

Por exibir estas atividades diversas supracitadas, os compostos fenólicos apresentam multifuncionalidade, sendo capazes de interferir no avanço de várias doenças crônicas, como diabetes, doenças cardiovasculares, carcinogênicas e neurodegenerativas, além de atuar na inibição de reações alérgicas e do envelhecimento, assim como estudos com fibroblastos dérmicos ou queratinócitos epidérmicos sugeriram efeitos benéficos sobre a pele humana (KALLI *et al.*, 2018).

No entanto, a utilização de uvas em processos industriais e na produção de vinhos resulta na grande geração de uma biomassa constituída por bagaço de uva (formada por sementes, pele e pedúnculo) ou peles isoladas, e ainda caules e borras, o que representa uma desvantagem atual do seu processamento, em muitos países, e a criação de procedimentos para a sua valorização é considerado uma questão global, que culmina na busca de soluções para sua utilização, de forma otimizada (MACHADO E DOMÍNGUEZ-PERLES, 2017).

2.2. Resíduos agroindustriais

A indústria alimentícia é considerada uma grande geradora de resíduos em todo o planeta, onde aproximadamente 38% do desperdício de alimentos ocorre ao longo do processamento destes produtos. Os subprodutos provenientes deste setor podem ser de origem animal (carcaças, peles, sangue, vísceras, soro e borra do processamento de laticínios, *etc.*) ou resultante da produção de derivados de vegetais, como por exemplo óleos, açúcares e sucos, onde podemos citar como exemplos as cascas, sementes, caules, farelo, entre outros (HELKAR, SAHOO E PATIL, 2016).

O desperdício de alimentos ou de seus resíduos geralmente está relacionado a produtos alimentícios e suas porções que podem ser incluídas na dieta humana mas que são descartados, degradados ou relegados ao consumo por pragas. Porém, ainda de acordo com estes autores, os resíduos de alimentos podem ser considerados uma potencial fonte de compostos funcionais, com propriedades nutricionais e reológicas relevantes, onde entre eles podemos citar

os macronutrientes, fibras e compostos bioativos (HELKAR, SAHOO E PATIL, 2016).

Atualmente existe uma demanda em expansão por produtos “verdes”, e desta forma os resíduos agroindustriais apresentam qualidades que podem ser exploradas na busca por novas matérias primas deste tipo (Rondeau *et al.* 2013).

A geração de resíduos agroindustriais tem aumentado de maneira proporcional ao crescimento da produção de alimentos processados, e estes subprodutos são gerados em diversas etapas do processamento, desde a obtenção da matéria-prima no campo, perpassando pela fabricação até a distribuição final (SIROHI *et al.*,2020).

Conforme ressaltado por Helkar, Sahoo e Patil (2016), apesar de representar um desafio para os fabricantes devido ao alto custo ligado a seu gerenciamento e tratamento, o descarte de resíduos alimentares industriais em grande escala é prejudicial ao meio ambiente, devido a sua estabilidade biológica e oxidativa reduzida, em contrapartida ao valor nutricional, teor de compostos orgânicos e atividade de água e enzimática elevadas, que favorecem a decomposição microbiana e podem ser prejudiciais a saúde humana e ambiental.

Embora represente um custo adicional para as indústrias de alimentos e o setor agrícola, a gestão de resíduos tem gerado uma demanda por métodos de controle que auxiliem a reduzir os gastos associados e os possíveis danos decorrentes a saúde humana, além de minimizar os impactos ambientais enquanto contribuem para o desenvolvimento das empresas e da economia nacional (HELKAR, SAHOO E PATIL, 2016).

2.2.1. Utilização de resíduos agroindustriais e o desenvolvimento sustentável.

Um dos grandes desafios do século atual é reaproveitar de forma sustentável os resíduos agroindustriais, utilizando-os para fins diversos, como produzir alimentos, fármacos, compostos bioativos, biomateriais e também gerar energia de forma sustentável(FREITAS *et al.*, 2021).

Tal percepção pode ser em função do conceito de sustentabilidade que tem como característica o alcance de algo que apresente durabilidade, viabilidade e que seja capaz de se conservar, de forma contínua. E um dos fundamentos basilares de seu desenvolvimento é de que os modelos de produção atualmente utilizados, em diferentes setores, não prejudiquem a vida das futuras gerações. (ARAÚJO *et al.* (2018).

Noções relacionadas à sustentabilidade passaram a ganhar magnitude nos anos de 1950, em decorrência da tendência de crescimento da preocupação da população, em escala global, acerca da influência que as ações humanas poderiam causar ao meio ambiente, e na década seguinte já era possível ver a realização de debates entre diferentes nações, e o surgimento de propostas para preservação do meio ambiente, que continuam a ser dialogadas até o presente, inclusive com a participação do Brasil (ARAÚJO *et al.*, 2018).

Atualmente, diversos esforços têm sido feitos em busca da promoção da sustentabilidade em todo o planeta. E para somar a estas ações, em setembro de 2015, durante a Assembleia Geral da Organização das Nações Unidas, foi elaborada a resolução intitulada como “Transformando nosso mundo: a Agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável”, que reúne 17 Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS, Figura 1) e 169 metas a serem atingidas (ONU, 2015).

Figura 1. Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS)



Fonte: adaptado de ONU (2015); IPEA (2018).

Os ODS reúnem ações e mudanças que devem ser implementadas de forma integrada e colaborativa por todos os países, e que buscam equilibrar de forma positiva as três dimensões que constituem o desenvolvimento sustentável, que são econômica, social e ambiental. Tais objetivos buscam atuar em prol não somente da preservação do meio ambiente, mas também de tudo aquilo que o cerceia, como a favor da promoção da paz, da igualdade e da justiça social, da erradicação da pobreza e da fome, entre outras questões (ONU, 2015).

O governo brasileiro seguiu as recomendações da ONU sobre a necessidade de levar em consideração a realidade de cada nação no desenvolvimento de estratégias para alcance dos ODS, e promoveu adaptações que atendem as características e especificidades do país, descritas no documento “ ODS – Metas Nacionais dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável”, porém sem deixar de tomar como base a agenda global (IPEA, 2018).

Em consonância com o progresso do desenvolvimento da consciência ambiental por parte da sociedade e da promoção de políticas públicas nesse sentido, as legislações ligadas às questões ambientais também têm evoluído e se tornado cada vez mais rígidas, e tais mudanças influenciam diretamente o setor de atividades econômicas, onde as empresas tem necessitado se adaptar a estes novos paradigmas, incluindo aquelas envolvidas nos diferentes segmentos do agronegócio (ARAÚJO *et al.*, 2018).

Dentre os diferentes ramos do agronegócio, podemos citar a agroindústria, que exhibe um grande potencial de geração de resíduos. De acordo com Gómez-Garcia *et al.* (2021), atualmente o descarte e a gestão incorreta dos subprodutos agroindustriais têm ocasionado danos tanto ambientais, como sociais e econômicos.

Anualmente, cerca de 1,3 bilhão de toneladas de subprodutos são geradas pela indústria mundial de alimentos, e são descartados pelas suas unidades produtoras, representando uma perda financeira de aproximadamente 990 bilhões de dólares (GÓMEZ-GARCIA *et al.*, 2021). Adicionalmente, sua

gestão incorreta também pode causar danos a saúde dos seres humanos e do ambiente (HELKAR ,SAHOO E PATIL, 2016),

Comumente desperdiçados, os resíduos agroindustriais poderiam ser reaproveitados para a obtenção de novos produtos, em especial pelo fato de que são potenciais fontes de fibras, vitaminas, minerais e compostos com atividade antioxidante, que contribuem positivamente para a saúde humana, e sua utilização também colaboraria para evitar impactos negativos ao meio ambiente em decorrência de seu descarte (ARAÚJO *et al.*, 2018).

Assim, a utilização de resíduos agroindustriais para o desenvolvimento de novos produtos contribuiria para o alcance dos ODS, em especial daqueles relacionados à garantia da saúde e bem estar da população, à promoção do crescimento econômico, à garantia de padrões de consumo e produção sustentáveis e à promoção do uso sustentável dos ecossistemas terrestres (ONU, 2015).

E diante disto, utilizar o resíduo advindo do processamento de uvas e explorar seu potencial biotecnológico seria uma alternativa benéfica do ponto de vista econômico, social, fisiológico e ambiental e contribuiria para o desenvolvimento sustentável.

2.2.2. Resíduos agroindustriais de uva

Os resíduos agroindustriais são considerados ricos em compostos bioativos, e atualmente diversos países tem direcionado seus esforços para reaproveitar tais atributos destes subprodutos de alto valor agregado (SIROHI *et al.* 2020).

De acordo com Kalli *et al.* (2018), com o aumento da preocupação acerca da sustentabilidade da demanda agrícola e da crescente busca pelo consumo de compostos naturais ao invés dos sintéticos, a utilização de subprodutos da uva tem despertado grande interesse, na forma de diversos produtos como aditivos alimentares, nutracêuticos, ingredientes de alimentos funcionais e suplementos dietéticos, medicamentos, fertilizantes, ração animal, componentes antimicrobianos, cosméticos, bem como biomassa para biocombustíveis.

Considerada uma das frutas mais cultivadas em todo o mundo, a uva tem sua produção estimada em quantidades acima de 60 milhões de toneladas/ano, e associada a ela está a viticultura, que produz grandes quantidades de resíduos deste fruto, composto principalmente por cascas, além de sementes e talos, que quando não aproveitados são destinados a compostagem ou descartados em locais inapropriados, podendo causar danos ambientais (RONDEAU *et al.*, 2013).

Associado ao cultivo da uva também está o processamento de sucos que, segundo Toaldo *et al.* (2013), apresenta quantidades elevadas de polifenóis, em teores que podem variar em função da espécie e cultivar do fruto utilizado na sua elaboração.

A produção de suco de uva é uma atividade com grande potencial de geração de resíduos, e durante este processamento, apesar dos compostos fenólicos presentes no fruto serem transferidos para a bebida, uma quantidade elevada permanece na matéria prima residual obtida após a fabricação deste derivado (HAAS *et al.*, 2020).

Segundo Sirohi *et al.* (2020), são encontrados no bagaço de uva diferentes compostos bioativos, e entre eles estão os fenólicos, caracterizados por serem metabólitos secundários de plantas aos quais estão associados benefícios a saúde humana, como atividades antioxidante, anti-inflamatórias, antivirais e antimicrobianas, que divergem de acordo com o tipo de uva.

A extração de óleo de semente de uva (parte do fruto que também é constituinte de seus resíduos), produto amplamente comercializado pela indústria, pode ser realizada ao mesmo tempo em que a recuperação das fibras alimentares antioxidantes e de extratos fenólicos provenientes de cascas de uva e sementes de uva desengordurada é feito, representando assim um método sustentável, com aproveitamento integral do resíduo e economicamente rentável e viável (KALLI *et al.*, 2018).

Segundo Kalli *et al.* (2018), as sementes de uva exibem ação antioxidante e pró-oxidante, inibindo a indução do câncer através da modulação do equilíbrio redox, bem como demonstram coordenar a *up* e *down-regulation* de quinases MAPK, PI3K / Akt, NF-kB, de proteínas do citoesqueleto e de metaloproteinases.

Atualmente, as propriedades dos alimentos têm sua importância reconhecida mundialmente, devido a sua capacidade de manter a homeostase genética, a viabilidade e o funcionamento adequado do organismo, em um mundo cada vez mais afetado pela poluição antropogênica da biosfera e pelo impacto de diferentes fatores químicos, físicos e psicoemocionais, onde a alimentação pode contribuir para minorar o estresse oxidativo e atuar na prevenção de mutações (SARKISIAN, 2019).

2.3. Compostos bioativos presentes no resíduo agroindustrial de uva

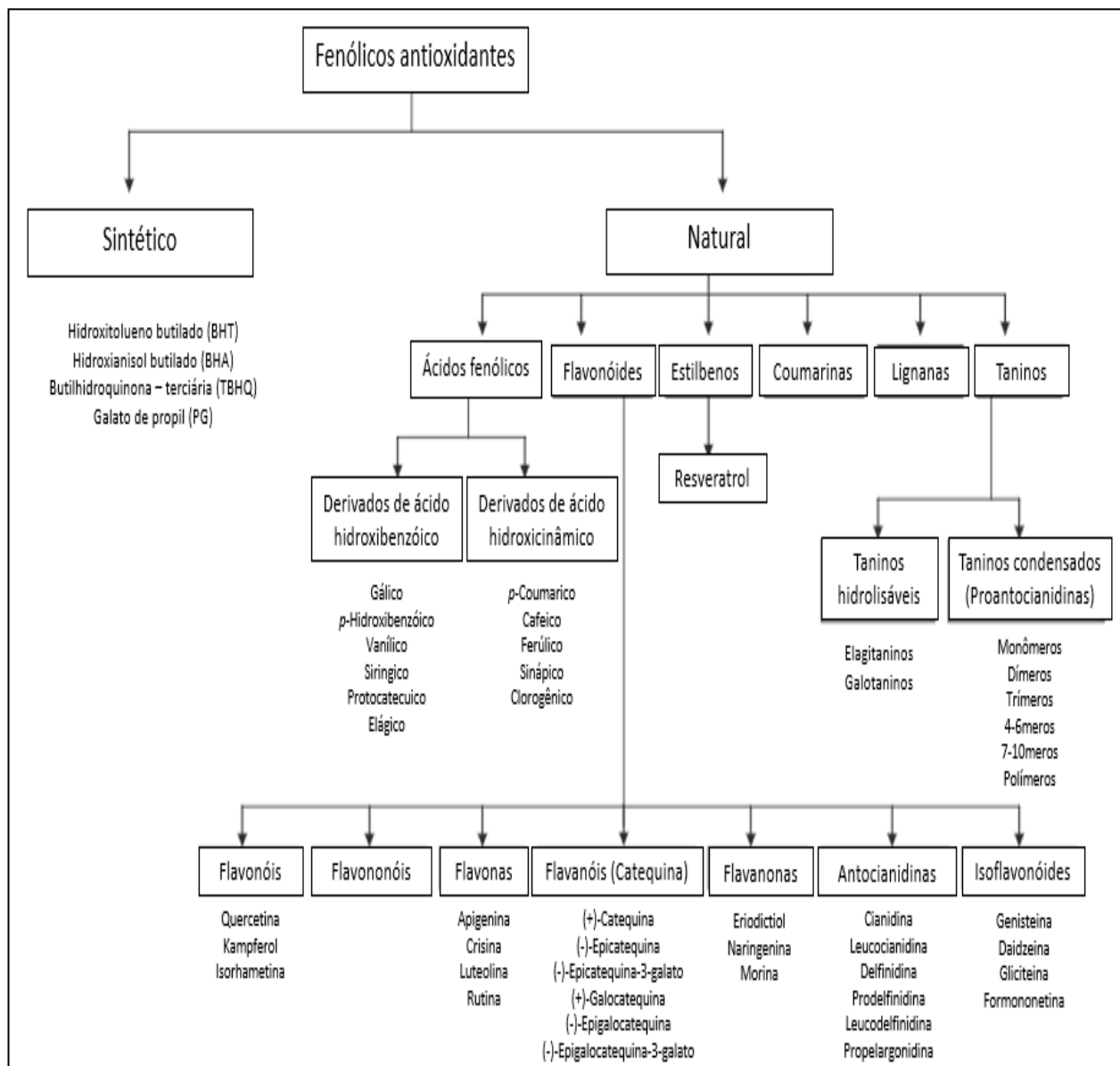
2.3.1. Compostos fenólicos

Os fitoquímicos definidos como fenólicos são metabólitos secundários das plantas, que quando presentes na sua parte externa atuam na proteção contra a luz solar, porém também agem internamente na formação das paredes celulares e ainda como agentes antibacterianos (SHAHIDI e YEO, 2018).

Também denominados de compostos químicos bioativos não nutritivos, os fitoquímicos podem ser encontrados em frutas e hortaliças diversas, em quantidades que variam de 5 a 25 mil tipos individuais, e dentre eles podemos citar os fenólicos, que apresentam propriedades benéficas à saúde, como atividade antioxidante e atuação na prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes, inflamações crônicas e câncer (ACOSTA-ESTRADA *et al.*, 2014).

A estrutura dos compostos fenólicos é formada por um anel aromático, com uma ou várias hidroxilas, e estes fitoquímicos podem ser desde moléculas elementares simples até compostos poliméricos complexos (BERES *et al.*, 2017). De acordo com Shahidi e Ambigaipalan (2015), os fenólicos com propriedades antioxidantes podem ser classificados de acordo com sua natureza, em sintéticos e naturais, conforme pode ser visualizado na Figura 2.

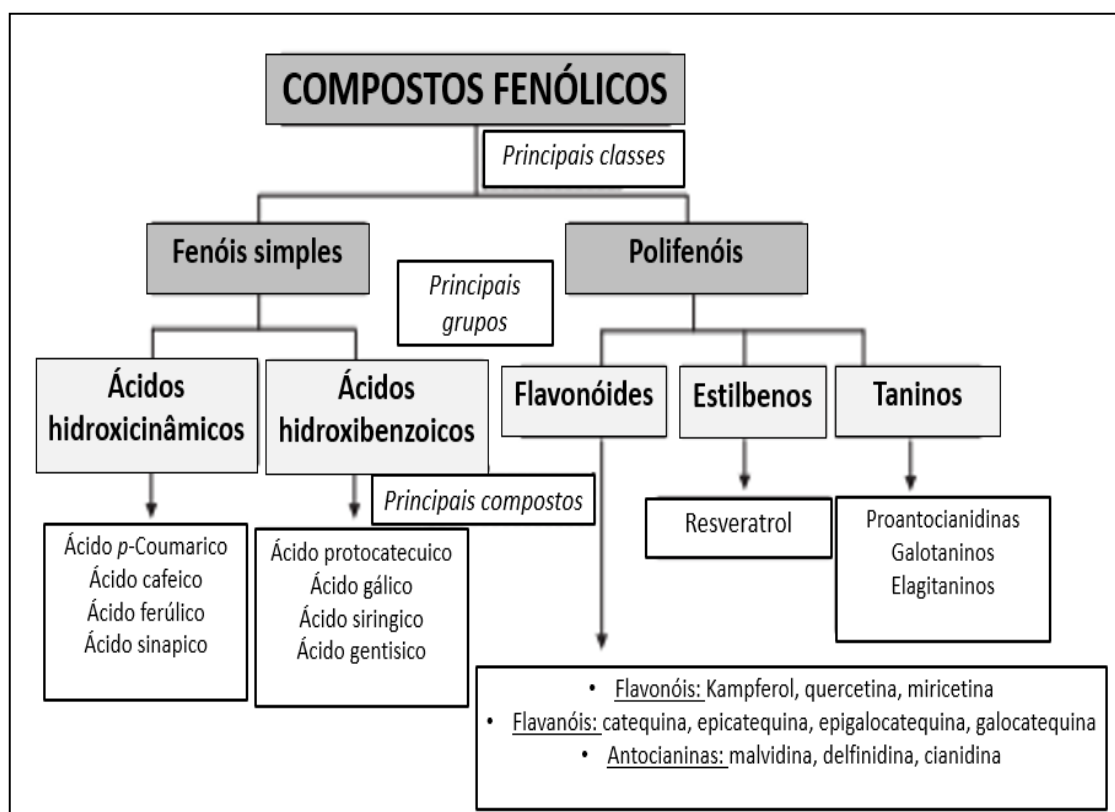
Figura 2. Classificação dos compostos fenólicos antioxidantes



(SHAHIDI E AMBIGAIPALAN, 2015)

No que diz respeito ao bagaço de uva, os fenólicos nele presentes podem ser divididos em 3 grupos, conforme demonstrado na Figura 3, que são o dos ácidos fenólicos, flavonoides e taninos (BERES *et al.*, 2017).

Figura 3. Compostos fenólicos majoritários presentes no resíduo de uva



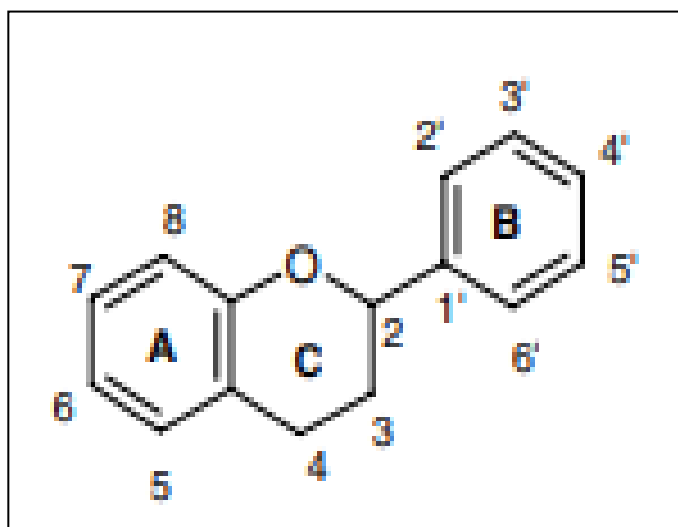
(BERES *et al.*, 2017).

De forma geral, os fenólicos são subdivididos em: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas, ligninas, lignanas e taninos (SHAHIDI e YEO, 2018). Os ácidos fenólicos apresentam dois principais sub-grupos, denominados de ácidos hidroxicinâmicos (ácidos p-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico) e hidroxibenzoicos (ácidos p-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico, siríngico e gálico), e são comumente definidos como uma classe de fenólicos primária, que se apresentam geralmente em formas conjugadas, especialmente por atuar na formação das paredes celulares das plantas, construindo espécies de “pontes” com moléculas como celulose, hemicelulose e pectina (SHAHIDI e YEO, 2018).

Quando encontrados em produtos naturais, os ácidos fenólicos estão geralmente em suas formas insolúveis ou ligadas, ao passo que os flavonoides estão disponíveis como glicosídeos, dotados de uma única molécula de açúcar ou várias, que podem estar ligadas através de grupo OH, denominando-se *O-glicosídeos*, ou em ligações do tipo carbono-carbono, nomeados assim de *C-glicosídeos* (ACOSTA-ESTRADA *et al.*, 2014).

Já os flavonoides, outro tipo de composto fenólico, apresentam em sua estrutura 15 átomos de carbono, com conformação C6-C3-C6, e baixo peso molecular, sendo dotados de 2 anéis aromáticos ligados por 3 carbonos comumente reunidos em formato de anel heterocíclico, conforme pode ser visualizado na Figura 4 (SHAHIDI e YEO, 2018; BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006), e podem ser classificados em flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanas, flavononas, isoflavonas e antocianidinas (SHAHIDI e YEO, 2018).

Figura 4. Estrutura química básica de um flavonoide



(BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006).

Atividades biológicas de importância fundamental a saúde humana são atribuídas aos flavonoides, tais como propriedades anti-inflamatórias, anti-virais e anti-câncer, e ainda são capazes de contribuir para diminuição da ocorrência de doenças cardiovasculares e da diabetes tipo 2 (SHAHIDI e YEO, 2018).

Quanto aos outros tipos de compostos fenólicos existentes, temos: os estilbenos (1,2-difeniletano), que apresentam uma estrutura de carbono do tipo C6-C2-C6, e dentre as atividades biológicas que apresentam podemos citar como exemplo a antibacteriana; as cumarinas, também chamadas de benzopironas, com estrutura C6-C3 dotada de um heterocíclico oxigenado no C3, e que apresentam atividade anticoagulante; os fenólicos denominados poliméricos, como as ligninas que são polímeros de monolignóis; e o taninos, que podem ser subdivididos em hidrolisáveis (elagitaninos e galotaninos) ou condensados (proantocianidinas) (SHAHIDI e YEO, 2018).

As substâncias bioativas podem ser definidas como compostos químicos presentes nas plantas e também em determinados alimentos (em quantidades menores), e que tem o potencial de contribuir para a promoção e manutenção da saúde humana. Os compostos fenólicos encontrados no bagaço de uva, que apresentam este caráter bioativo, tem exibido diferentes propriedades biológicas, como atividade antimicrobiana, anticâncer, anti-inflamatória e antitrombótica, além de contribuir com a prevenção da ocorrência da diabetes, de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, e também de alergias e de processos de envelhecimento (SIROHI *et al.*, 2020).

2.3.2. Antocianinas

As antocianinas podem ser definidas como uma das subclasses do grupo dos compostos fenólicos, e recebem este nome quando estão na forma de glicosídeo, ao passo que na sua forma aglicona são chamadas de antocianidinas. No que diz respeito às antocianidinas, elas podem ser subdivididas em: 3-hidroxi-antocianidinas, 3-deoxi-antocianidinas e antocianidinas O-metiladas; já as antocianinas se subdividem em glicosídeos de antocianidina e antocianinas aciladas (KHOO *et al.*, 2017).

Geralmente presentes em diferentes flores e frutos, em especial os de coloração vermelha, roxa e azul, as antocianinas podem ser encontradas nestas partes de diferentes tipos de plantas, sejam elas comestíveis ou não. No que diz respeito as flores que são fontes de antocianinas (como hibisco vermelho, rosa e trevo vermelho, flor rosa, chicória e alecrim azul, violeta, lavanda, menta roxa,

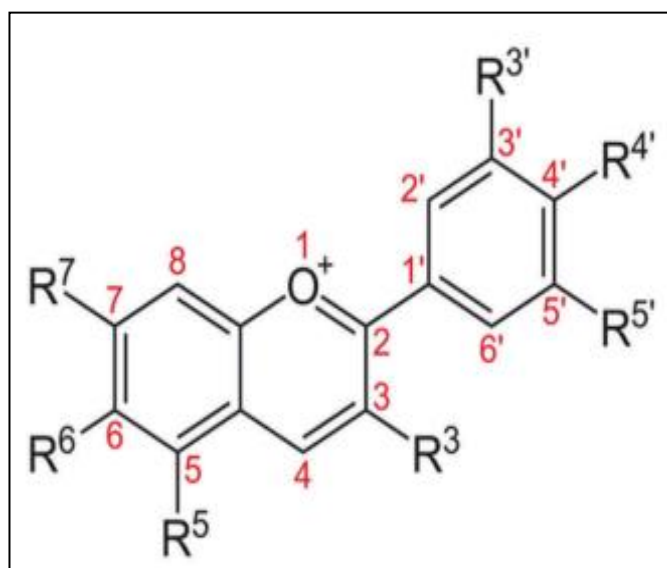
entre outras), elas vêm sendo utilizadas na medicina popular, como corante ou ainda para inserção na dieta humana (MATTOS *et al.*, 2017; KHOO *et al.*, 2017).

Já as frutas de cor vermelha, roxa e azul têm tido o seu consumo associado a benefícios à saúde humana, visto que as antocianinas nelas presentes tem sido consideradas detentoras de forte potencial antioxidante, ao mesmo tempo que alguns vegetais nestes tons de coloração (cenoura preta, repolho e batata roxa, por exemplo) tem tido seu consumo associado a potencial prevenção de doenças (KHOO *et al.*, 2017).

As antocianinas apresentam em sua estrutura diversos grupos hidroxila fenólicos, que atuam na proteção das plantas contra compostos que promovem a oxidação, e atrelados a esta funcionalidade, estão seus potenciais bioativos como sua capacidade anti-inflamatória, anticâncer, antioxidante, antiobesidade, além de atuar na prevenção da diabetes e de problemas na visão (MA *et al.*, 2019).

As antocianinas pertencem ao grupo dos flavonoides, têm a estrutura formada por dois anéis benzil e um anel heterocíclico, no entanto apresentam uma carga positiva atrelada ao oxigênio do anel C de sua estrutura básica (Figura 5), sendo assim também denominada como íon “*flavylium*” (2-fenilcromenílio) (SMERIGLIO *et al.*, 2016; KHOO *et al.*, 2017). Consistem em pigmentos presentes em diferentes vegetais (flores, frutas, tubérculos, *etc*), que apresentam coloração desde vermelho, azul ou roxo (ALVAREZ-MARTINEZ *et al.*, 2020; KHOO *et al.*, 2017).

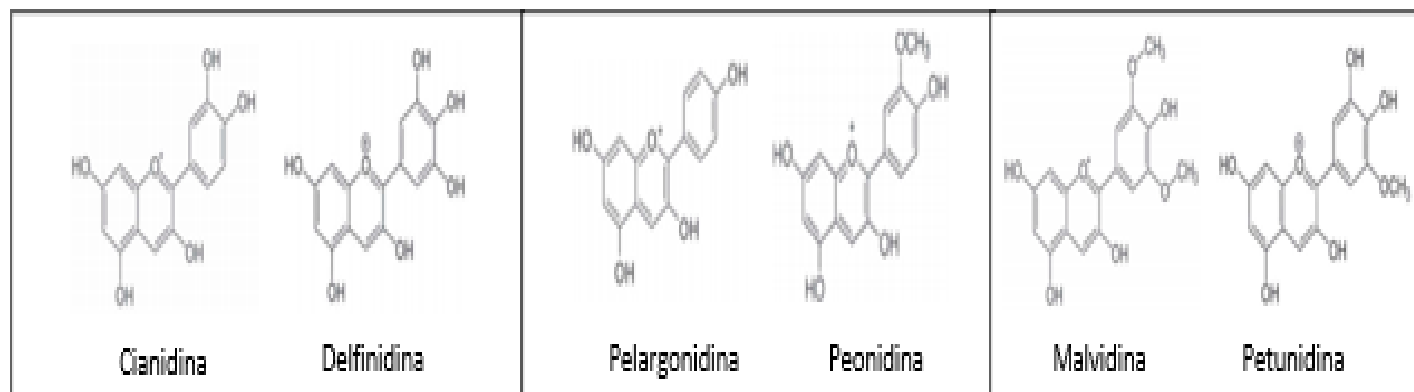
Figura 5. Estrutura básica das antocianinas

(KHOO *et al.*, 2017)

Antocianina apresenta como estrutura básica o íon *flavilium*, com a ausência de um oxigênio cetônico na posição 4, e as ligações conjugadas presentes nesta molécula, em decorrência de sua forma glicosilada ou acilada, são responsáveis pelas colorações que conferem as plantas, que perpassam pelo vermelho, azul e roxo (KHOO *et al.*, 2017).

Dentre as antocianidinas mais comumente encontradas estão a cianidina, delphinidina, pelargonidina, peonidina, petunidina e malvidina (Figura 6), e além das antocianinas glicosiladas, as na forma acilada também estão presentes nas plantas e podem ser categorizadas em 4 tipos diferentes, como antocianinas acriladas, coumaroilada, cafeoilada e malonilada (Khoo *et al.*, 2017).

Figura 6. Principais tipos de antocianidinas encontradas em plantas



(Adaptada de KHOO *et al.*, 2017).

De acordo com Khoo *et al.* (2017), as antocianinas são geralmente obtidas a partir de métodos de extração em flores, frutos e hortaliças vermelhas, pretas ou roxas, utilizando água ou solventes orgânicos para isolar tais pigmentos, devido a sua solubilidade nestes meios, ao passo que não são solúveis em substâncias apolares e não apresentam estabilidade em soluções de caráter alcalino ou neutro.

Quando antocianinas agliconas sofrem o processo de malonilação (acilação) ocorre a preservação da cor do pigmento, mas que esta característica sensorial está intrinsecamente relacionada a quantidade de hidroxilas ligadas ao anel B da estrutura molecular do composto (KHOO *et al.*, 2017). Estes flavonoides apresentam ainda uma característica comum a esta subclasse fenólica, que é a possibilidade de exibir grupos hidroxila e metoxilas com padrões de substituição diversos (SHAHIDI e YEO, 2018).

As antocianinas já são utilizadas tradicionalmente com fins medicinais, seja como nutracêutico ou estimulante de apetite, ou ainda como fitofármacos, compostos com ação colerética e no tratamento e prevenção de diversas enfermidades, visto que são reconhecidas por contribuir para saúde dos olhos, apresentar efeitos anti-obesidade, neuroprotetivos e de redução de inflamações,

bem como por suas propriedades antiangiogênicas no enfrentamento ao desenvolvimento de cânceres (KHOO *et al.*, 2017).

2.4. Potencial antioxidante dos resíduos agroindustriais de uva

Os compostos com atividade antioxidante apresentam a propriedade de bloquear a formação e propagação de radicais livres, através de diferentes mecanismos, tais como a eliminação de radicais, quelação de íons metálicos, interrupção de reações de oxidação em cadeia e ainda pela diminuição da concentração de moléculas oxidantes (SIROHI *et al.*, 2020).

Testes *in vitro* acerca da atividade antioxidante das antocianinas demonstraram seu potencial em neutralizar eventos responsáveis pela inicialização de processos de oxidação, seja pela absorção de fótons ou a neutralização de espécies reativas ao oxigênio, além de quelação de íons metálicos, contribuindo assim para bloquear as fases iniciais do mecanismo de auto-oxidação (TENA, MARTÍN E ASUERO, 2020).

De acordo com Sorrenti *et al.* (2015), as espécies reativas ao oxigênio (EROS) estão associadas a diferentes doenças devido à ativação de diferentes vias de sinalização transdutora e transcricional. No entanto, apesar da produção desordenada de radicais livres ser capaz de eliminar ou fortalecer um tumor, as células cancerígenas geralmente apresentam níveis elevados de estresse oxidativo intrínseco, em função do crescimento da formação destes radicais (SORRENTI, *et al.* 2015).

Entre os compostos fenólicos antioxidantes sintéticos mais comuns, que podem ser utilizados na produção de alimentos, temos o hidroxianisol e o hidroxitolueno butilados (BHA e BHT, respectivamente), e ainda o galato de propila (PG) e a butilhidroquinona terciária (TBHQ), porém, ao longo dos últimos anos, a possibilidade destas substâncias serem tóxicas aos seres humanos vêm sendo considerada, e os antioxidantes advindo de fontes naturais passaram a ser apontados como possíveis substitutos a estes componentes artificiais na indústria de alimentos (SHAHIDI E AMBIGAIPALAN, 2015).

As antocianinas apresentam potencial de prevenir ou inibir processos de oxidação, atuando na eliminação de radicais livres e na redução do estresse oxidativo, seja através da doação de átomo de hidrogênio ou a partir da transferência de um elétron. No entanto, esta capacidade antioxidante das antocianinas sofre influência de diferentes fatores, como concentração, estrutura química e ambiente (TENA, MARTÍN E ASUERO, 2020).

A atividade antioxidante de compostos naturais é diretamente influenciada por fatores como temperatura, oxigênio, luz e ainda por características atreladas à composição dos alimentos onde são encontrados, entre eles o pH, força iônica e o estado físico que o mesmo apresenta (SIROHI *et al.*,2020). Assim, diferentes metodologias são utilizadas a fim de determinar este potencial.

O método DPPH• (radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil) baseia-se em uma análise espectrofotométrica aplicável para amostras sólidas e líquidas, e pode ser empregado para determinação da capacidade antioxidante total das substâncias, por não apresentar especificidade quanto aos tipos de agentes antioxidativos específicos. Esta metodologia baseia-se no potencial de reação do radical DPPH• com o composto doador de hidrogênio, onde a 515nm ocorre a diminuição da absorbância quando há redução do radical livre (TENA, MARTÍN E ASUERO, 2020).

Outro método de determinação da atividade antioxidante é o que utiliza o radical ABTS^{•+} (radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), que quando estável apresenta absorbância máxima em leituras a 415 nm, porém esta diminui quando ocorre a reação com o composto antioxidante. O método ABTS atualmente mais utilizado é colorimétrico, e se baseia na geração de um radical estável azul-verde, o cromóforo ABTS^{•+}, através da reação entre o ABTS e o persulfato de potássio (TENA, MARTÍN E ASUERO, 2020).

De acordo com Tena, Martín e Asuero (2020), o ensaio de atividade antioxidante utilizando o radical ABTS pode ser utilizado para avaliar este potencial em misturas de substâncias, contribuindo para diferenciar efeitos aditivos e sinérgicos, e é calculado em comparação com a reatividade de um composto padrão, o Trolox, sob as mesmas condições, o que torna o método

também reconhecido como Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico), nomeado com a sigla “TEAC”.

Diferentes metodologias podem ser utilizadas nos métodos ABTS e TEAC que, apesar de utilizarem o mesmo radical livre, podem fazer uso de reagentes diferentes para a produção de seu cromóforo (resultante da oxidação do ABTS), assim como tempos de reação e comprimentos de onda díspares. Este ensaio apresenta como pontos positivos à sua utilização a simplicidade e fácil reprodução, além de se adequar a quantificação da capacidade antioxidativa de alimentos hidrofílicos e lipofílicos (TENA, MARTÍN E ASUERO, 2020).

2.5. Potencial antimicrobiano dos resíduos agroindustriais de uva

A ampla utilização de antibióticos em atividades agrícolas e da pecuária tem ocasionado o aumento da resistência de microrganismos de origem alimentar frente a estes medicamentos, contribuindo para a disseminação destas doenças e conseqüentemente, a ausência de fármacos eficazes contra tais infecções (MA *et al.*, 2019).

Os compostos fenólicos presentes em frutas ou extratos produzidos a partir destas, ricos nestes fitoquímicos bioativos, tem sido associados em diferentes estudos a diferentes propriedades benéficas à saúde, dentre elas a atividade antibacteriana. Estes fitoquímicos com potencial antimicrobiano são encontrados em níveis elevados nas uvas, em especial nas cascas e sementes do fruto (LIMA *et al.*, 2019).

De forma geral, os polifenóis tem apresentado ação antimicrobiana, contribuindo por exemplo para reduzir o transporte de microrganismos patógenos no nível de produção primária, e isto também inclui as antocianinas, ao mesmo tempo que esses compostos bioativos não causam os efeitos adversos atrelados aos tratamentos tradicionais (antibióticos), onde entre eles podemos citar a diarreia, contribuindo assim para a saúde intestinal (MA *et al.*, 2019). Ademais, esses fitoquímicos têm sido reconhecidos como potenciais

candidatos a adjuvantes de antibióticos no combate a bactérias patogênicas (LIMA *et al.*, 2019)

Compostos com atividade antibacteriana ou antiviral são aqueles capazes de eliminar ou inibir a ação destes microrganismos sem causar prejuízos as células e tecidos em seu entorno, e os fenólicos têm sido reconhecidos como detentores deste potencial, de forma relevante (SHAHIDI e YEO, 2018). E segundo Tungmunnithum *et al.*, (2018), diversos tipos de flavonoides e fenólicos apresentam ação antibacteriana, e dentre eles podemos citar as antocianinas.

Além das antocianinas exercerem potencial antibacteriano nos alimentos em si, também contribuem para regular a composição da microbiota intestinal humana, atuando assim na prevenção de doenças ocasionadas por patógenos advindos de alimentos (MA *et al.*, 2019).

As antocianinas têm como característica serem pigmentos em tons atrativos de vermelho, azul e roxo, obtidos de fontes de naturais que apresentam toxicidade reduzida ou até mesmo ausente, o que os torna mais seguros para utilização e consumo na indústria de alimentos e bebidas, quando em comparação com pigmentos obtidos de forma artificial (KHOO *et al.*, 2017).

A composição fenólica dos resíduos de uva, como por exemplo os advindos da vinificação (matéria prima rica em antocianinas), é fortemente influenciada por diferentes fatores, entre eles: condições geoclimáticas, parte do fruto, tipos de cultivares tintas e brancas e processamento empregado, entre outros (TROŠT *et al.*, 2016).

Tais características acabam por gerar subprodutos da produção de vinhos únicos em sua constituição, onde o teor de compostos fenólicos estará intrinsecamente ligado a tais atributos, com propriedades antioxidantes e antimicrobianas diversas, que por sua vez também sofrem influência dos solventes usados em sua extração (TROŠT *et al.*, 2016).

Segundo Sirohi *et al.* (2020), no bagaço de uva são encontrados diversos tipos de compostos bioativos, tais como os fenólicos, que são reconhecidos por apresentarem diferentes atividades, dentre elas a antimicrobiana. E desta forma,

este subproduto representa uma potencial matéria prima detentora de tais propriedades e economicamente viável, que pode ser utilizada na indústria de cosméticos, farmacêutica, alimentícia ou de ração animal.

2.6. Potencial anticâncer dos resíduos agroindustriais de uva

O câncer, considerado uma das principais causas de morte a nível mundial, pode ter seu desenvolvimento associado, dentre diversos fatores, ao desequilíbrio bem como aos níveis elevados de radicais livres (como as espécies reativas ao oxigênio e ao nitrogênio), que podem atuar como agentes mutagênicos ou carcinogênicos (TUNGMUNNITHUM *et al.*, 2018).

No combate a esta doença, vem sendo tradicionalmente utilizada a quimioterapia, no entanto ela apresenta como desvantagem os efeitos colaterais danosos que ocorrem durante sua utilização, e desta forma, a procura por novos tipos de tratamentos que apresentem efeitos adversos reduzidos e menor custo tem sido alvo de interesse (TUNGMUNNITHUM *et al.*, 2018).

Plantas, de diferentes espécies, geralmente possuem componentes químicos que atuam contra a proliferação do câncer, bloqueando a progressão do ciclo celular e induzindo a apoptose associada à fragmentação do DNA, sendo extremamente desejável quando apresentam citotoxicidade apenas contra células cancerosas e não contra células normais (VIZZOTO *et al.*, 2014).

Os compostos fenólicos, substâncias bioativas presentes em uvas e seus subprodutos, apresentam diferentes efeitos anti-carcinogênicos, como: indução da parada do ciclo celular; inibição da cascata de sinalização oncogênica, que exerce controle sobre diferentes mecanismos, dentre eles a proliferação, angiogênese e apoptose celular; modulação dos teores de espécies reativas ao oxigênio (EROS); capacidade de promoção de proteínas supressoras de tumor, entre elas a p53; elevam o potencial de diferenciação e transformação em células normais, entre outros (ANANTHARAJU *et al.*, 2016).

As antocianinas são compostos pertencentes ao grupo dos flavonoides (subclasse dos compostos fenólicos) que, do ponto de vista biológico, são

capazes para estimular a diferenciação celular e reduzir a inflamação celular, angiogênese e metástase (JOHNSON *et al.*, 2011).

Segundo Huang *et al.* (2011), a apoptose é uma forma de morte celular programada, sendo basicamente definida por condensação citoplasmática, formação da membrana plasmática e picnose nuclear e (segundo esses autores), induz dano ao DNA de forma dose-dependente.

As caspases são responsáveis por promover a apoptose por diferentes processos: indução de enzimas destrutivas, por exemplo DNases; promoção da liberação mitocondrial do citocromo C via proteínas da família Bcl-2; e destruição das principais proteínas estruturais e regulatórias (ZIKRI *et al.*, 2009). São divididos em dois subgrupos, denominados: upstream, que engloba as caspases 2, 8, 9 e 10, responsáveis pelo início da cascata das caspases ao receber estímulos pró-apoptóticos; e a jusante, que inclui as caspases 3, 6 e 7, reconhecidas como "executoras", responsáveis pela destruição celular (ZIKRI *et al.*, 2009; SLEE *et al.*, 2001).

Cho *et al.* (2017) também afirmam que a apoptose é uma forma de morte programada da célula, caracterizada por vários fenômenos celulares que levam à degradação do DNA nuclear em fragmentos oligonucleosais. Em consonância com tal característica, este mecanismo pode contribuir para inibir a proliferação de células tumorais, e diferentes estudos tem confirmado o potencial das antocianinas em promover a apoptose em linhagens cancerígenas diversas (MAZEWSKI *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2018; CHO *et al.*, 2017; ANWAR *et al.*, 2016; GARCÍA-VARELA *et al.*, 2016; CHAREPALLI *et al.*, 2015; SORRENTI *et al.*, 2015).

No que diz respeito a influência das antocianinas na expressão de genes e proteínas associadas ao desenvolvimento do câncer, pesquisas tem demonstrado a capacidade deste flavonoide em contribuir positivamente quanto ao processo antiinflamatório (DAI, PATEL e MUMPER, 2007), além de diminuir a capacidade de migração e invasão de células cancerígenas *in vitro* (KUNTZ *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2006).

A invasão tumoral é regulada por um processo biológico composto de diferentes etapas, que envolvem a motilidade celular, a formação de estruturas semelhantes a tubos e a degradação da matriz e a migração celular (PARK *et al.*, 2014). As células tumorais que escapam da massa tumoral degradam a matriz extracelular circundante durante a invasão tumoral, e uma variedade de proteases produzidas por células tumorais estão envolvidas na degradação da matriz extracelular (CHEN *et al.*, 2006).

De acordo com Chen *et al.* (2006), a interação célula-matriz é importante para o mecanismo de invasão de linhagens de células cancerígenas, uma vez que essa interação afeta a locomoção desses tipos de células e a expressão de proteinases. Sorrenti *et al.* (2015) declaram que o câncer é reconhecido como um estado reversível atribuído a uma maturação incomum, onde o fenótipo que sofreu transformação pode vir a ser suprimido, tanto por agentes citostáticos como por indução farmacológica, a uma forma não-maligna.

Antocianinas isoladas, bem como extratos com alto teor deste composto fenólico, tem exibido atividade anti-migratória (KUNTZ *et al.*, 2017; PARK *et al.*, 2014), efeitos anti-metastáticos (LIU *et al.*, 2014) e causado danos ao DNA e ao ciclo celular de diferentes linhagens cancerígenas (ZHOU *et al.*, 2018).

Além disso, podemos citar a delfinidina-3-O-glucosídeo como um exemplo de antocianina que pode atuar na redução de efeitos colaterais como a diarreia causada por agentes quimioterápicos, sem reduzir seus efeitos em órgãos-alvo (AINCHINGER *et al.*, 2016).

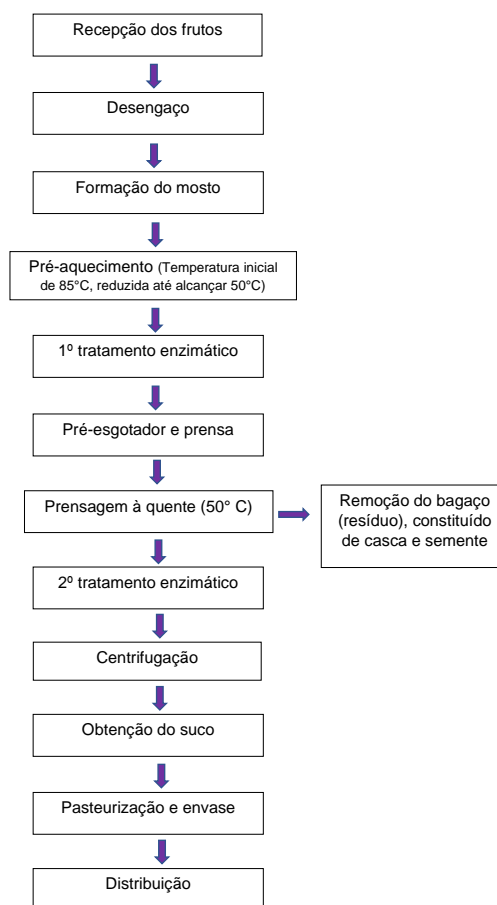
De acordo com Khoo *et al.* (2017), as antocianinas apresentam potencial antiangiogênico, e com isso, podem ser utilizadas como fármaco natural no tratamento de cânceres, visto que a angiogênese constitui-se como etapa fundamental na transição de tumores de um caráter benigno para maligno, ao passo que, na prevenção desta doença, este potencial é capaz de bloquear a formação de novos vasos sanguíneos, que são cruciais para fornecer oxigênio as células tumorais em desenvolvimento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção das amostras

Os resíduos de uva cultivar Isabel (*Vitis labrusca* L.) e cv. Magna (BRS Magna) foram cedidos por uma unidade processadora de suco de uva, localizada na região do Vale do São Francisco, em Petrolina-PE (Latitude Sul 09° 21'; Longitude Oeste 40° 40', após processamento conforme descrito na Figura 7. Os resíduos de uva Isabel e os da uva Magna foram coletados na indústria, ambos úmidos e constituídos por cascas e sementes, denominado de bagaço bruto. Após quarteamento da amostra, os bagaços foram acondicionados em sacos plásticos, contendo 100 g cada, armazenados em local protegido da luz e submetidos ao congelamento à -18° C.

Figura 7. Fluxograma da produção do suco integral de uva



Para a obtenção de resíduo de uva Isabel e do resíduo de uva Magna, ambos em pó, os resíduos foram descongelados sob refrigeração (5 °C por 24 horas), quando então foram levados a desidratar em estufa com circulação de ar a $47 \pm 2^\circ \text{C}$, por 8 horas, até atingir teor de umidade abaixo de 10%. Em seguida, foram triturados para a obtenção do resíduo em pó, e após serem peneirados utilizando uma peneira de 80 *mesh* para obter uma granulometria uniforme, foram separadamente acondicionados em sacos plásticos de polipropileno e armazenados em temperatura de congelamento de -18°C .

3.2. Extração e purificação das antocianinas

Os resíduos, úmidos e desidratados (em pó) de uvas cv. Isabel e Magna, foram submetidos a extração com acetona a 70% acidificada (0,01% HCl) e logo em seguida filtrados até a remoção completa das antocianinas. Os filtrados resultantes foram submetidos à partição com dois volumes de clorofórmio e armazenados a $4^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ por uma noite, a fim de possibilitar a separação das fases apolar e polar. A fase aquosa foi submetida ao evaporador rotatório ($38^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$, 10 min \pm 5min, sob vácuo) para a remoção total da acetona e clorofórmio residual, e os extratos antociânicos em fase aquosa obtidos foram armazenados a $-18^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ para uso em análises posteriores (RODRIGUEZ-SAONA; WROLSTAD, 2001).

A purificação dos extratos antociânicos aquosos (EAA) obtidos foi realizada por meio de extração em fase sólida (SPE, Solid Phase Extraction), utilizando cartuchos de C18 600mg, em conformidade com metodologia descrita por Rodriguez-Saona e Wrolstad (2001) visando a remoção de açúcares, ácidos e outros compostos fenólicos não antociânicos. O extrato metanólico resultante foi concentrado a vácuo, em rotaevaporador ($38^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$), até a obtenção de um resíduo seco ao qual foi adicionado éter dietílico, com o objetivo de precipitação dos pigmentos (ESPÍN *et al.*, 2000). As antocianinas em pó obtidas a partir de ambos resíduos foram armazenadas sob congelamento ($-18^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$) até o momento de sua utilização.

3.3. Determinação das antocianinas totais

A quantificação de antocianinas totais foi realizada de acordo com o método de pH diferencial (LEE; DURST; WROLSTAD, 2005). Os extratos antocianínicos aquosos foram diluídos em tampões com pH 1,0 (cloreto de potássio, 0,025M) e pH 4,5 (acetato de potássio, 0,4M). Após 15 minutos de repouso a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), as absorvâncias foram mensuradas em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650PC) a 520 nm e 700 nm. O teor dos pigmentos foi calculado considerando a absorvidade molar (ϵ) de 28.000 L/cm²/mol e o peso molecular de 493,2 g/mol da malvidina 3-glicosídeo, e os resultados foram obtidos aplicando a seguinte fórmula:

$$\text{Antocianinas monoméricas} = A \times \text{PM} \times \text{FD} \times 1000 / \epsilon \times 1$$

Onde: $A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1,0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4,5}$; PM é o peso molecular; FD é o fator de diluição; ϵ é a absorvidade molar.

Os resultados foram expressos em mg de malvidina 3-glicosídeo/ g de resíduo.

3.4. Identificação e quantificação das antocianinas

3.4.1. Análises cromatográficas

A quantificação das antocianinas através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE – DAD) foi realizada de acordo com metodologia descrita por Natividade *et al.* (2013). Os solventes utilizados foram o metanol, acetnitrila e ácido fosfórico (85%), especificamente em grau HPLC, obtidos da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil), J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA) e Fluka (Suíça), de forma respectiva, bem como água ultra pura, obtida por meio de um Purelab Option Q Elga System (EUA).

Os padrões utilizados foram: cloreto de pelargonidina-3-O-glicosídeo (cloreto de calistefina), cloreto de cianidina-3,5-diglicosídeo (cloreto de cianina), cloreto de cianidina-3-glicosídeo (cloreto de curomanina), cloreto de malvidina-

3-5-di-O-diglicosídeo (cloreto de malvina), cloreto de delphinidina-3-glicosídeo (cloreto de mirtilina), cloreto de malvidina-3-glicosídeo (cloreto de oenina), cloreto de peonidina-3-O-glicosídeo e cloreto de petunidina-3-O-glicosídeo (cloreto de petunidina), adquiridos da Extrasynthese (Genay, France). Para cada padrão, foram preparadas soluções-estoque, em metanol, e posteriormente foram preparadas misturas dos padrões utilizados, em 8 concentrações diferentes conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração das soluções-estoque e intermediária das antocianinas em estudo.

Antocianinas	Solução-estoque ($\mu\text{g/mL}$)	Faixa de concentração ($\mu\text{g/mL}$)
cloreto de pelargonidina-3-O-glicosídeo	2500	0,625 - 80
cloreto de cianidina-3,5-diglicosídeo	2000	0,625 - 80
cloreto de cianidina-3-glicosídeo	1000	0,625 - 80
cloreto de malvidina-3-5-di-O-diglicosídeo	4000	1,25 - 160
cloreto de delphinidina-3-glicosídeo	2500	0,625 - 80
cloreto de malvidina-3-glicosídeo	5000	1,5625 - 200
cloreto de peonidina-3-O-glicosídeo	1000	0,3125 - 40
cloreto de petunidina-3-O-glicosídeo	1000	0,3125 - 40

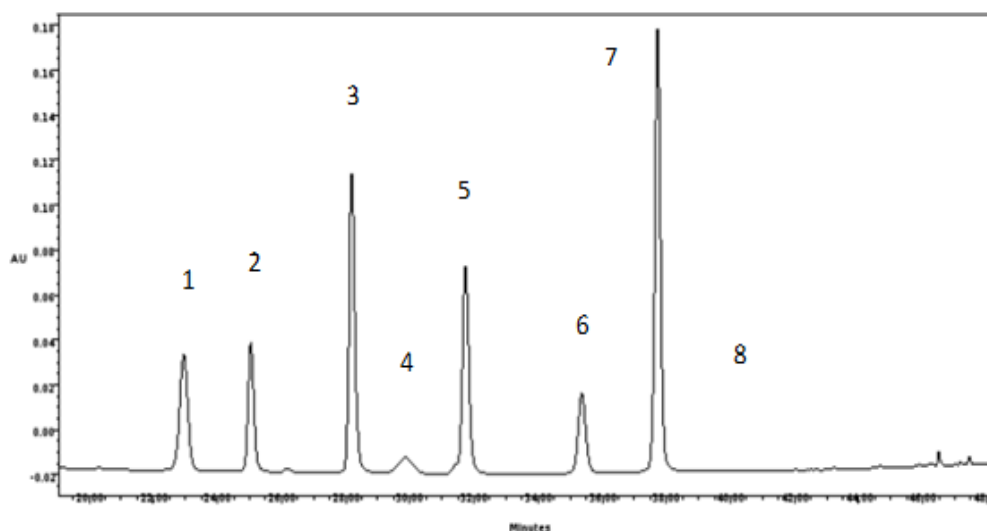
Para a realização das análises, alíquotas dos extratos antociânicos secos em centrifuga a vácuo (3 ml) e de antocianinas purificadas (10mg) foram encaminhadas em criotubos, armazenados em caixa de isopor, para o Laboratório de Cromatografia da Embrapa Semiárido (Petrolina-PE). Para injeção no CLAE-DAD, os extratos e as antocianinas purificadas foram previamente ressuspensos em mistura (diluyente) de metanol e de ácido fosfórico a 0,85% (extrato seco - 3 eppendorfs com 1mL:3mL da mistura; 10 mg

de antocianinas purificadas:4 mL da mistura) e em seguida filtradas em membrana de nylon de 0,45 μm (Allcrom-Phenomenex, EUA).

Para a quantificação das antocianinas, foi utilizado o sistema de CLAE “Waters e2695 Separation Module Alliance”, dotado de bomba de solvente quaternária, injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD, Waters modelo 2998). Foi utilizada a pré-coluna Gemini-NX C18 coluna Gemini NX C-18 (150 mm \times 4,6 mm \times 3 μm) (Phenomenex, EUA), a 40 °C, onde as amostras foram injetadas em volume de 10 μL , e a fase móvel foi constituída de uma mistura em gradientes do solvente A e B (solução de ácido fosfórico a 0,85% e acetonitrila, respectivamente), com taxa de vazão de 0,5 mL/min. Primariamente, o gradiente foi iniciado com 100% do solvente A; em seguida, ajustado para 93% de A e 7% de B, em 10 min; 90% de A e 10% de B, em 20 min; 88% de A e 12% de B, em 30 min; 77% de A e 33% de B, em 40 min; 65% de A e 35% de B, em 45 min; e 100% de A, de 55 a 60 min.

O processamento dos dados foi realizado através do software Waters Empower TM 2 (Milford, EUA). O cromatograma obtido para as soluções padrão das 8 antocianinas estudadas e seus respectivos tempos de retenção estão dispostos na Figura 8.

Figura 8. Cromatograma das antocianinas (soluções padrão) e seus respectivos tempos de retenção (TR)



1:

cloreto de cianidina-3,5-diglicosídeo (cloreto de cianina) (TR:22,9 min); 2: cloreto de delphinidina-3-glicosídeo (cloreto de mirtilina) (TR: 25,0 min); 3: cloreto de cianidina-3-glicosídeo (cloreto de curomanina) (TR: 28,2 min); 4: cloreto de malvidina-3-5-di-O-diglicosídeo (cloreto de malvina) (TR: 29,9 min); 5: cloreto de pelargonidina-3-O-glicosídeo (cloreto de calistefina) (TR: 31,8 min); 6: cloreto de peonidina-3-O-glicosídeo (TR: 35,4 min); 7: cloreto de malvidina-3-glicosídeo (cloreto de oenina) (TR: 37,7 min); 8: petunidina-3-glicosídeo (cloreto de petunidina-3-O-glicosídeo) (TR: 40,8 min)

3.4.2 Análises espectrométricas

As análises espectrométricas foram realizadas no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE, Brasil), com bases nas metodologias propostas por Alves Filho *et al.* (2019), Silva *et al.* (2017) e Capanoglu *et al.* (2013), Foi utilizando um sistema Acquity UPLC (Waters, EUA) acoplado a um sistema de massa Xevo Quadrupolo e Tempo de voo (Q-TOF, Waters, em inglês *Quadrupole Time-of-flight*). Uma coluna Waters Acquity BEH C18 para a condição de separação (150 mm × 2,1 mm, 1,7 μm) estabelecida a 40 ° C. Um volume de injeção de alíquota de 5 μL de extrato fenólico foi submetido a um gradiente exploratório com a fase móvel composta por água deionizada (A) e acetonitrila (B), ambas contendo ácido fórmico (0,1% v/v). Os extratos foram submetidos ao gradiente exploratório da seguinte forma: 2–95% B (23,0 min), 100% B (24,0-27,0 min) com uma vazão de 0,22 mL/min.

A ionização no espectrômetro de massas QTOF (Water, Milford, MA, EUA) foi realizada usando uma fonte de ionização por eletrospray em modo negativo, adquirido na faixa de 110-1200Da e os parâmetros instrumentais otimizados foram os seguintes para negativo: energia de voltagem de capilar em 2,8kV, energia de voltagem do cone de amostragem a 50 V, temperatura da fonte a 120°C, temperatura de dessolvatação a 350°C, fluxo de gás do cone a 20 L/h, fluxo do gás de dessolvatação a 500 L h/1. O modo de aquisição foi MS^E. O sistema foi controlado usando o software MassLynx 4.1 (Waters Corporation).

3.5. Determinação da atividade antioxidante

3.5.1. Sequestro do radical DPPH•

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos antociânicos aquosos e das antocianinas purificadas foi realizado pelo método de sequestro de radicais livres usando o radical estável DPPH• (VERAS *et al.*, 2020). As leituras foram realizadas a 517nm, e a atividade antioxidante foi expressa em µg de equivalente de Trolox por mL de extrato e em mg de equivalente de Trolox por g de antocianinas purificadas, usando uma curva padrão construída com diferentes concentrações do padrão (31,25 - 1000 µg / mL). Todos os ensaios foram realizados em triplicata

3.5.2 Sequestro do radical ABTS^{•+}

A atividade antioxidante do dos extratos antociânicos aquosos e das antocianinas purificadas pelo ensaio ABTS^{•+} foi baseada na geração do radical cromóforo catiônico obtido a partir da oxidação do ABTS^{•+} (DE VERAS *et al.*, 2019). As leituras foram realizadas a 734nm, e a atividade antioxidante foi expressa em µg de equivalente de Trolox por mL de extrato e mg de equivalente de Trolox por g de antocianinas purificadas, usando uma curva padrão construída com diferentes concentrações do padrão (31,25 - 1000 µg / mL). Todos os ensaios foram realizados em triplicata

3.5.3 Capacidade antioxidante total (CAT)

A capacidade antioxidante total foi determinada pelo método do fosfomolibdênio (Prazeres *et al.*, 2019). O ensaio foi baseado na redução de molibdênio +6 a molibdênio +5 pela amostra e subsequente formação de um complexo fosfato esverdeado / molibdênio +5. Tubos contendo as amostras e reagentes (ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM) foram incubados a 100 ° C por 90 min. Posteriormente, as absorvâncias de cada solução foram medidas a 695 nm contra um branco. As leituras foram realizadas a 695nm, e a capacidade antioxidante total foi expressa em µg de equivalente de ácido ascórbico (AA) mL de extrato e em mg de equivalente de ácido ascórbico (AA) por g de antocianinas purificadas, usando uma curva padrão construída com diferentes concentrações de ácido ascórbico (31,25 - 1000 µg / mL). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.5.4 Poder Redutor

O poder redutor dos extratos antociânicos aquosos e das antocianinas purificadas foi determinado de acordo com o método de Melo-Silveira *et al.* (2014). As amostras foram diluídas de metanol e misturadas com tampão fosfato (2,5 mL, 0,2 M, pH 6,6) e ferricianeto de potássio [C₆N₆FeK₃] (2,5 mL, 1%); a mistura foi incubada a 50 ° C por 20 min. As leituras foram realizadas a 700nm, e o poder redutor foi expresso em µg de equivalente de ácido gálico (AG) por mL extrato e em mg de equivalente de ácido gálico (AG) por g de antocianinas purificadas, usando uma curva padrão construída com diferentes concentrações de ácido gálico (31,25 - 1000 µg / mL). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.6. Atividade antimicrobiana

3.6.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) – Técnica da microdiluição

A técnica da microdiluição é uma adaptação da macrodiluição em caldo. É denominada desta maneira porque envolve o uso de pequenos volumes de

caldo colocados em placas estéreis de 80, 96 ou mais poços de fundo redondo ou chato, próprias para microdiluição (ALVES *et al.*, 2008).

A diluição das substâncias testes, que neste caso corresponderam aos extratos antociânicos aquosos (30µL de extrato em 3 mL de água destilada estéril) e as antocianinas purificadas (30mg de antocianinas purificadas em 3mL de água destilada estéril) foi realizada em duplicata para cada microrganismo (cada 2 colunas corresponderam a um microrganismo e substância teste - Colunas 1,2 para *Escherichia coli* e substância teste; 3 e 4 para *Staphylococcus aureus* e substância teste; 5 e 6 para *Salmonella* e substância teste; 7 e 8 para *Listeria monocytogenes* e substância teste. As linhas A até H da placa de 96 poços corresponderam a diferentes concentrações da substância teste, iniciando da mais concentrada (A) para menos concentrada (H), e a sua diluição foi realizada segundo demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição das soluções nas colunas 1 e 2 para extratos antociânicos aquosos e antocianinas purificadas na concentração mãe de 10mg/mL

Poços	Caldo BHI (µL)	Substância teste (µL)	Inóculo (µL)	Volume Final do Poço (µL)	Concentração final da substância Teste (µg/mL)
A1 A2	20	60	20	100	6000
B1 B2	30	50	20	100	5000
C1 C2	40	40	20	100	4000
D1 D2	50	30	20	100	3000
E1 E2	60	20	20	100	2000
F1 F2	65	15	20	100	1500
G1 G2	70	10	20	100	1000
H1 H2	80	0	20	100	500

As microplacas foram preparadas de forma que cada poço tivesse um volume final de 100 µL, com proporções variadas do meio de cultura e das substâncias testes, atingindo ao final, diferentes concentrações da substância teste (Tabela 2).

A concentração final de substância teste é calculada pela fórmula:

$$C_f V_f = C_i V_i,$$

onde C_f é a concentração final a ser descoberta; V_f é o volume final em cada poço; C_i é a concentração inicial (referente a solução mãe); e V_i = volume inicial da substância teste mãe (dependente do volume de cada linha analisada).

A todos os poços foram adicionados 20 μ L do inóculo microbiano. O microrganismo foi incubado a 37°C por 24 horas e terminado o período de incubação, foram adicionados 30 μ L de resazurina em cada poço das colunas ímpares, e nos controles. A microplaca foi então recolocada na estufa a 37°C. A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) é um composto indicador de óxido-redução de cor azul que, na presença de células viáveis, é oxidado a resofurina, substância de coloração vermelha (PALOMINO *et al.*, 2002). Logo, a coloração azul indica ausência de crescimento microbiano enquanto as variações de rosa e roxo são indicadoras da presença de células viáveis para crescimento. Após 1 hora foi feita a análise da mudança de cor, e determinada a CIM.

3.6.2. Percentual de inibição microbiana dos extratos antociânicos aquosos

O percentual de inibição do crescimento microbiano atribuído aos extratos antociânicos em fase aquosa foi calculado com base na metodologia descrita por Barthi *et al.* (2013), com modificações. A leitura da Densidade Ótica (DO) de cada amostra foi realizada em leitor de placas ELISA, a 492 nm, antes e depois da incubação (37°C).

A DO de cada substância teste, das réplicas, do controle (meio e microrganismo) e do meio antes da incubação (T_0) foi subtraída da DO após a incubação a 37°C (T_{24}), resultando no percentual de viabilidade de crescimento do microrganismo frente as amostras, conforme descrito no cálculo a seguir:

$$DO_{inicial} = DO_{LEITURA(T_0)} - DO_{SUBST\grave{A}NCIA\ TESTE(T_0)}$$

$$DO_{final} = DO_{LEITURA(T_{24h})} - DO_{SUBST\grave{A}NCIA\ TESTE(T_{24h})}$$

$$DO_{crescimento} = DO_{final} - DO_{inicial}$$

$$DO_{controle} = DO_{(T_{24h})} - DO_{(T_0)} \left\{ \begin{array}{l} DO_{T_0} = DO_{LEITURA(T_0)} - DO_{MEIO(T_0)} \\ DO_{24h} = DO_{LEITURA(T_{24h})} - DO_{MEIO(T_{24h})} \end{array} \right.$$

LOGO:

$$DO_{controle} \text{ ----- } 100\% \text{ viabilidade}$$

$$\therefore x (\% \text{ de viabilidade}) =$$

$$\frac{DO_{crescimento} \times 100}{DO_{controle}}$$

$$DO_{crescimento} \text{ ---- } x (\% \text{ de viabilidade})$$

Em seguida, o percentual de inibição de crescimento foi determinado através da fórmula abaixo:

$$\text{Percentual de inibição} = 100 - x (\% \text{ de viabilidade})$$

3.7 Atividade citotóxica

A atividade citotóxica foi realizada através do método do MTT brometo de 3-(4,5- dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (ALLEY *et al.*, 1988; MOSMANN, 1983). As linhagens de células utilizadas foram: HeLa (adenocarcinoma do colo do útero humano), Vero (célula normal de rim de macaco verde africano) e L929 (fibroblastos de camundongo), mantidas em meio de cultura DMEM; e MCF-7 (câncer de mama humano), mantida em meio de cultura RPMI 1640. Os meios foram suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina).

As células foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂. As células MCF-7, HeLa, Vero e L929 (10⁵ células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24h. Em seguida, as amostras foram dissolvidas em água destilada estéril e subsequentemente adicionadas aos poços (300 e 200 µg/mL, para extratos e antocianinas purificadas, respectivamente). O fármaco paclitaxel (10 µg/mL) foi utilizado como padrão. Após 72 h de reincubação foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL) e depois de 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foi aspirado e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm. O percentual de inibição e os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foram calculados a partir da regressão não linear no programa GraphPad Prism 7.0. demo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação das antocianinas totais (AT)

O teor de antocianinas monoméricas totais, obtidos pelo método do pH diferencial, a partir dos resíduos úmido e seco de uvas cv. Isabel e Magna estão apresentados na Tabela 3. Para o extrato obtido a partir do resíduo úmido, os teores de antocianinas monoméricas totais foram de 6,13 e 10,38 mg de malvidina 3-glicosídeo/ g de resíduo fresco, para uva cv.Isabel e cv.Magna, respectivamente.

Tabela 3. Teor de antocianinas totais presentes nos extratos antociânicos aquosos de resíduo úmido e seco de uva cv. Isabel e cv. Magna.

Tipo de resíduo de uva	Teor de AT em resíduo úmido (mg de M3G/ g de resíduo) *	Teor de AT em resíduo seco (mg de M3G/ g de resíduo) *
Resíduo de uva cv. Isabel	6,13 ± 0,40	11,80 ± 1,10
Resíduo de uva cv. BRS Magna	10,38 ± 1,03	22,78 ± 0,91

*Os valores apresentados referem-se à média aritmética de três determinações ± desvio padrão. AT = Antocianinas totais; M3G: malvidina-3-glicosídeo.

No que diz respeito a uva cv. Magna, valores menos expressivos foram relatados por Silva *et al.* (2020), que ao analisarem os resíduos fresco e seco do processamento do suco deste fruto, encontraram teores de antocianinas (AT) de 124,9 e 150,7 mg em equivalência a cianidina / 100 g, respectivamente.

Os valores obtidos no presente estudo foram menores que os relatados por Valls *et al.* (2017), que ao investigarem o conteúdo de antocianinas monoméricas totais em cascas de uva cv. Lagrein (provenientes de safras, tempos de colheita e composição fenólica diferentes), encontraram maiores teores para as amostras que não foram submetidas ao processo de maceração e fermentação inerentes ao processo de vinificação, com valores entre 18 a 25 mg de malvidina 3-O-glicosídeo/ g de resíduo fresco.

No entanto, em análise de extratos *etanólicos* de bagaço de uva cv. Syrah proveniente da produção de vinho (composto por cascas e semente), submetidos a diferentes condições de extração, Pereira *et al.* (2018) encontraram conteúdo de antocianinas monoméricas totais inferiores a do presente estudo, que variaram entre 1,90 a 10,21 mg de malvidina 3-O-glicosídeo/ g de resíduo fresco, apresentando maior teor de antocianinas em extração sob temperatura de 40°C, com solvente *etanol-água* (50% v/v) e pH 2,0.

Teores menores de antocianinas monoméricas totais também foram relatados por Valls *et al.* (2017), em análise de bagaço de uva cultivar Lagrein (constituído por cascas), oriundo do processo de vinificação, submetido a extração com diferentes solventes, que obteve valores que variaram entre 2 a 8 mg de malvidina 3-glicosídeo/ g de resíduo fresco, para bagaço proveniente do mesmo tipo de uva, porém com safras, tempos de colheita, maceração, fermentação e composição fenólica diferentes.

As variações entre os conteúdos de antocianinas relatados pelos autores podem ser justificadas pelos diferentes tipos de resíduos analisados, ora oriundos de processos de vinificação ora não, bem como por características inerentes as cultivares analisadas, visto que Kato *et al.* (2012) afirmam que em uvas as concentrações de antocianinas são influenciadas por diferentes parâmetros, tais como clima, tipo de espécie e de cultivar, maturidade e características físico – químicos.

No que diz respeito ao extrato obtido a partir do resíduo seco, os teores de antocianinas monoméricas totais foram de 11,80 e 22,78 mg de malvidina 3-glicosídeo/ g de resíduo seco, para uva cv. Isabel e cv. Magna, respectivamente (Tabela 3). Estes valores foram inferiores aos relatados por Cocklar (2017) ao analisarem cascas de uva cv. Ekşikara, (com solvente de extração por metanol a 80% acidificado), encontraram teores de antocianinas totais de 27,24 mg de malvidina 3-glicosídeo/ g de resíduo seco.

Em análise dos extratos (água, acetona e *etanol* como solvente) de bagaço de uva Bordô advindos do processamento de suco e da vinificação,

Casagrande *et al.* (2019) encontraram valores de AT de 640 e 780 mg em equivalência a cianidina-3-glicosídeo / g de amostra, respectivamente.

Balea *et al.* (2018) também encontraram conteúdos de antocianinas monoméricas totais superiores à do presente estudo, ao analisarem bagaço de uva Fetească neagră não fermentado, encontrando o teor de 184,84 mg malvidin-3-O-glucosídeo/g de resíduo seco. De acordo com estes autores as variações entre o conteúdo fenólico de bagaços de uva, onde estão incluídas as antocianinas, também está relacionado à variedade das uvas, grau de maturação, fatores ambientais e processos tecnológicos utilizados durante a vinificação.

Estas diferenças também podem ser justificadas pelo tipo de desidratação que foi utilizada na secagem do resíduo, visto que Cocklar (2017) e Balea *et al.* (2018) utilizaram o processo de liofilização no tratamento da amostra, enquanto que o presente estudo utilizou secagem em estufa de circulação forçada de ar a $47^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Segundo Pereira *et al.* (2018), temperaturas elevadas podem reduzir a recuperação de antocianinas, visto que tais compostos são sensíveis a temperatura, podendo ser degradados rapidamente, em especial por processos de oxidação, clivagem de ligações covalentes ou ainda o aumento das reações de oxidação, ocasionados pelo tratamento térmico.

No entanto, valores inferiores foram relatados por da Rocha e Noreña (2020), que ao avaliarem resíduo proveniente da produção de suco de uva, constituído por uma mistura de diferentes cultivares (70% de uva cv. Isabel, 15% de cv. Bordô, 10% de cv. Carmem e 5% de cv. Niágara), identificaram teores de antocianinas totais entre 2, – 3,0 mg/g e 1-1,5 mg de malvidina 3-5-glicosídeo/ g de resíduo seco, utilizando para a extração metanol a 80% acidificado (1% HCl) por 100 minutos, e água acidificada com ácido cítrico (2%) por 24h, respectivamente.

Variações entre os conteúdos de antocianinas totais de resíduos provenientes de diferentes tipos de uva são esperados, visto que até mesmo fatores ambientais exercem forte influência sobre a síntese de antocianinas

nestes frutos, como por exemplo a altitude onde as videiras e seus frutos estão localizados e a forma como a temperatura, exposição à luz solar e déficits de água a que estão expostos interferem na concentração e síntese das antocianinas (COCKLAR, 2017).

4.2. Identificação e quantificação das antocianinas

4.2.1. Análises cromatográficas – CLAE – DAD

As antocianinas podem ser definidas como uma das subclasses do grupo dos flavonoides, e recebem esse nome quando estão na forma de glicosídeo, ao passo que na sua forma aglicona são chamadas de antocianidinas. No que diz respeito as antocianidinas, elas podem ser subdivididas em: 3-hidroxiantocianidinas, 3-deoxiantocianidinas e antocianidinas O-meíladas; já as antocianinas se subdividem em glicosídeos de antocianidina e antocianinas aciladas (KHOO *et al*, 2017).

A análise cromatográfica permitiu a identificação e quantificação de 8 tipos de antocianinas majoritárias nos extratos antociânicos em fase aquosa e nas antocianinas purificadas a partir dos resíduos de uva cv. Isabel e Magna, conforme pode ser visualizado nas Tabelas 4 e 5. A estrutura bidimensional das antocianinas majoritárias quantificadas em extratos antociânicos em fase aquosa e em antocianinas purificadas a partir de resíduo de suco integral de uvas Isabel e Magna através de CLAE-DAD estão representados na Figura 9.

Tabela 4. Perfil de antocianinas majoritárias quantificadas em extratos antociânicos em fase aquosa de resíduo de suco integral de uvas Isabel e Magna através de CLAE-DAD.

Antocianinas (mg / L de diluente)	Extratos antociânicos em fase aquosa (mg / L de diluente)			
	Resíduo de uva Magna seco	Resíduo de uva Magna úmido	Resíduo de uva Isabel seco	Resíduo de uva Isabel úmido
cloreto de pelargonidina-3-O- glicosídeo ¹	5,79 ± 0,04	1,78 ± 0,03	1,58 ± 0,03	4,01 ± 0,02
cloreto de cianidina- 3,5-diglicosídeo ²	4,45 ± 0,01	1,24 ± 0,03	1,07 ± 0,01	1,17 ± 0,05
cloreto de cianidina- 3-glicosídeo ³	8,10 ± 0,10	1,60 ± 0,01	1,87 ± 0,06	2,92 ± 0,04
cloreto de malvidina- 3-5-di-O-diglicosídeo ⁴	147,61 ± 1,03	32,55 ± 0,65	20,25 ± 0,21	19,96 ± 0,15
cloreto de delphinidina- 3-glicosídeo ⁵	28,15 ± 0,01	11,27 ± 0,28	3,39 ± 0,08	9,19 ± 0,06
cloreto de malvidina- 3-glicosídeo ⁶	2,90 ± 0,01	2,17 ± 0,12	8,57 ± 0,09	17,21 ± 0,09
cloreto de peonidina- 3-O-glicosídeo ⁷	2,87 ± 0,10	0,11 ± 0,01	3,20 ± 0,02	7,11 ± 0,07
cloreto de petunidina- 3-O-glicosídeo ⁸	2,55 ± 0,03	0,42 ± 0,01	1,05 ± 0,01	0,74 ± 0,01

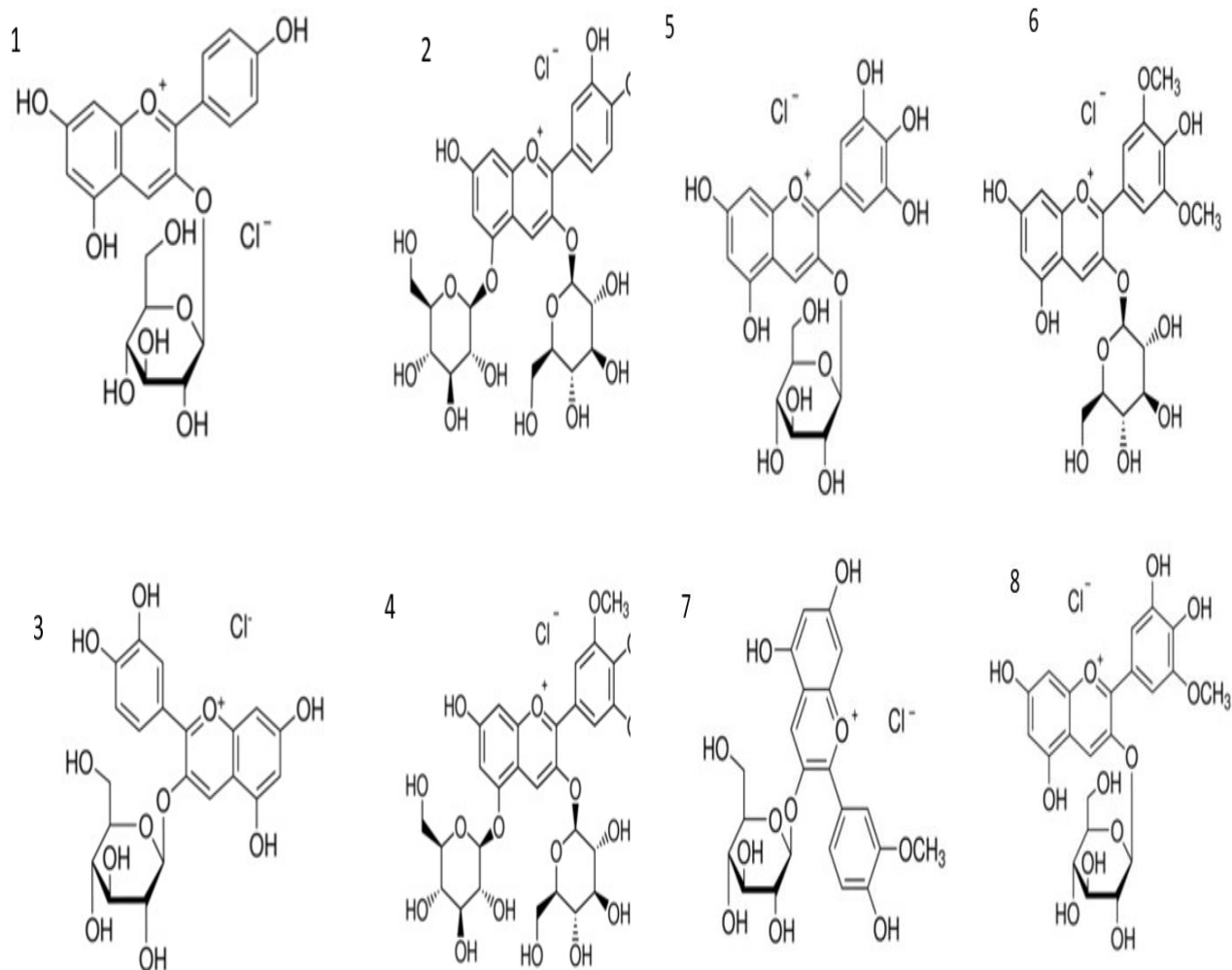
Os valores foram expressos como média de três repetições ± desvio padrão. Diluente: metanol e ácido fosfórico a 0,85%; Tempos de retenção (min): 1 – 31,1; 2 – 22,5 ;3 – 27,8 ;4 – 29,5;5 – 24,6 ;6 – 37,6 ;7- 35,1;8 – 40,4.

Tabela 5. Perfil de antocianinas majoritárias quantificadas em antocianinas purificadas a partir de resíduo de suco integral de uvas Isabel e Magna através de CLAE-DAD.

Antocianinas (mg / L de diluente)	Antocianinas purificadas (mg /L de diluente)			
	Resíduo de uva Magna seco	Resíduo de uva Magna úmido	Resíduo de uva Isabel seco	Resíduo de uva Isabel úmido
cloreto de pelargonidina- 3-O-glicosídeo ¹	5,24 ± 0,08	6,08 ± 0,28	6,32 ± 0,05	7,44 ± 0,04
cloreto de cianidina-3,5- diglicosídeo ²	3,76 ± 0,01	4,03 ± 0,03	2,14 ± 0,02	2,61 ± 0,01
cloreto de cianidina-3- glicosídeo ³	4,35 ± 0,11	5,68 ± 0,09	3,42 ± 0,09	4,23 ± 0,10
cloreto de malvidina-3-5- di-O-diglicosídeo ⁴	103,62 ± 0,24	107,59 ± 1,51	40,87 ± 0,05	40,48 ± 0,51
cloreto de delphinidina-3- glicosídeo ⁵	37,89 ± 0,13	40,17 ± 0,16	21,77 ± 0,18	27,72 ± 0,06
cloreto de malvidina-3- glicosídeo ⁶	5,47 ± 0,05	5,43 ± 0,02	24,89 ± 0,36	29,30 ± 0,06
cloreto de peonidina-3-O- glicosídeo ⁷	1,15 ± 0,01	1,24 ± 0,01	10,50 ± 0,09	12,38 ± 0,03
cloreto de petunidina-3-O- glicosídeo ⁸	0,51 ± 0,02	0,82 ± 0,01	0,50 ± 0,01	0,48 ± 0,01

Os valores foram expressos como média de três repetições ± desvio padrão. Diluente: metanol e ácido fosfórico a 0,85%; Tempos de retenção (min): 1 – 31,1; 2 – 22,5 ;3 – 27,8 ;4 – 29,5;5 – 24,6 ;6 – 37,6 ;7- 35,1;8 – 40,4.

Figura 9. Estrutura das antocianinas majoritárias quantificadas em extratos antociânicos em fase aquosa e em antocianinas purificadas a partir de resíduo de suco integral de uvas Isabel e Magna através de CLAE-DAD.



Fonte: SigmaAldrich (URL: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/search/>). 1 - pelargonidina-3-O-glicosídeo; 2 - cianidina-3,5-diglicosídeo; 3 - cianidina-3-glicosídeo; 4 - malvidina-3-5-di-O-diglicosídeo; 5 - delphinidina-3-glicosídeo; 6 - malvidina-3-glicosídeo; 7 - peonidina-3-O-glicosídeo; 8 - petunidina-3-O-glicosídeo

A partir dos resultados obtidos, foi possível constatar que o conteúdo de antocianinas dos extratos de resíduos de uva Magna seco e úmido foi de 202,42 e 51,42 mg/L, respectivamente, enquanto que os teores encontrados no resíduo de uva Isabel seco e úmido foram de 40,98 e 62,31 mg/L, respectivamente

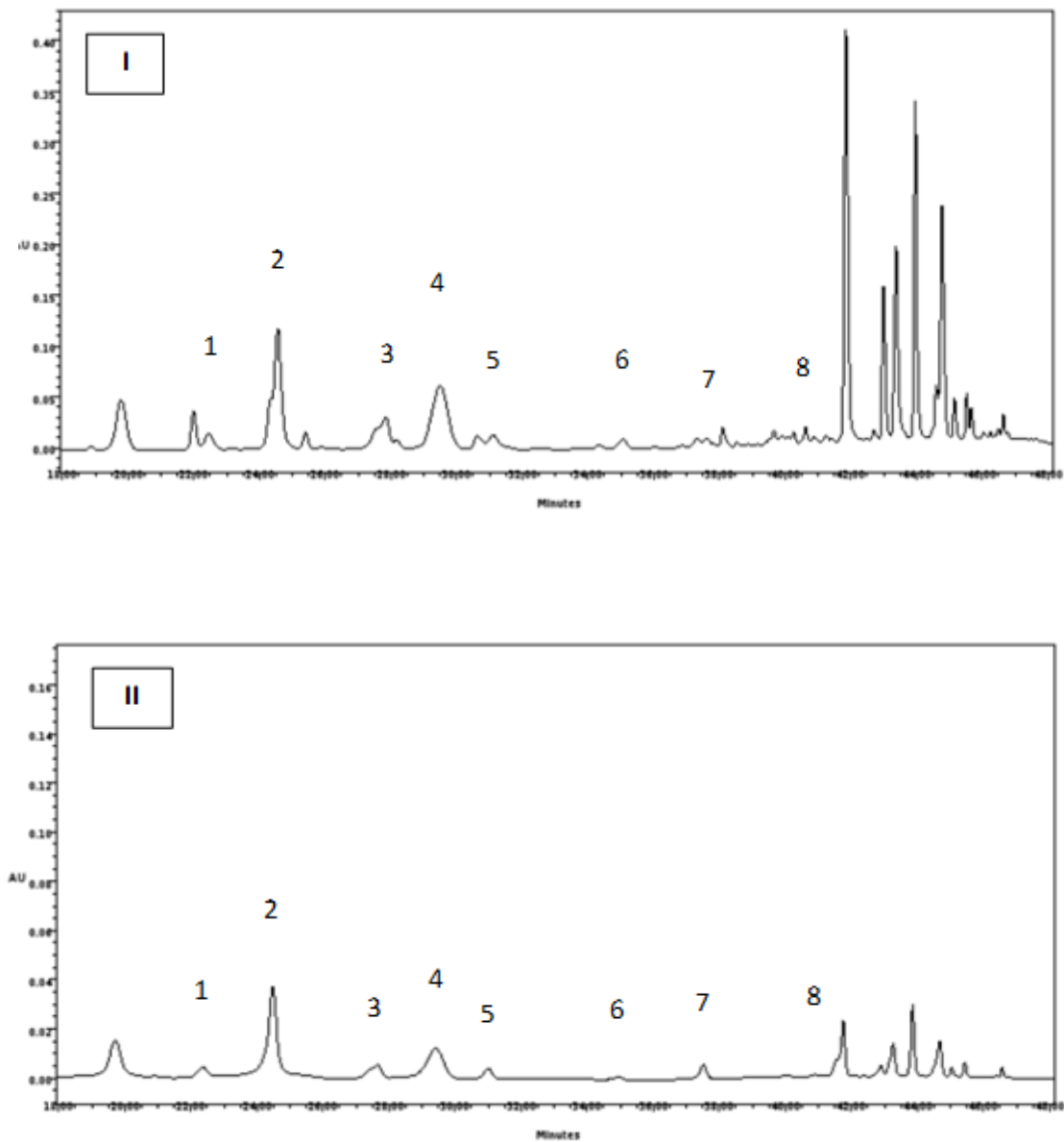
(Tabela 4). Com relação às antocianinas purificadas obtidas dos resíduos de uva Magna seco e úmido, os valores encontrados foram de 161,99 e 171,04 mg/L, enquanto que os teores das antocianinas obtidas dos resíduos de uva Isabel seco e úmido foram de 110,41 e 124,64 mg/L, respectivamente (Tabela 5).

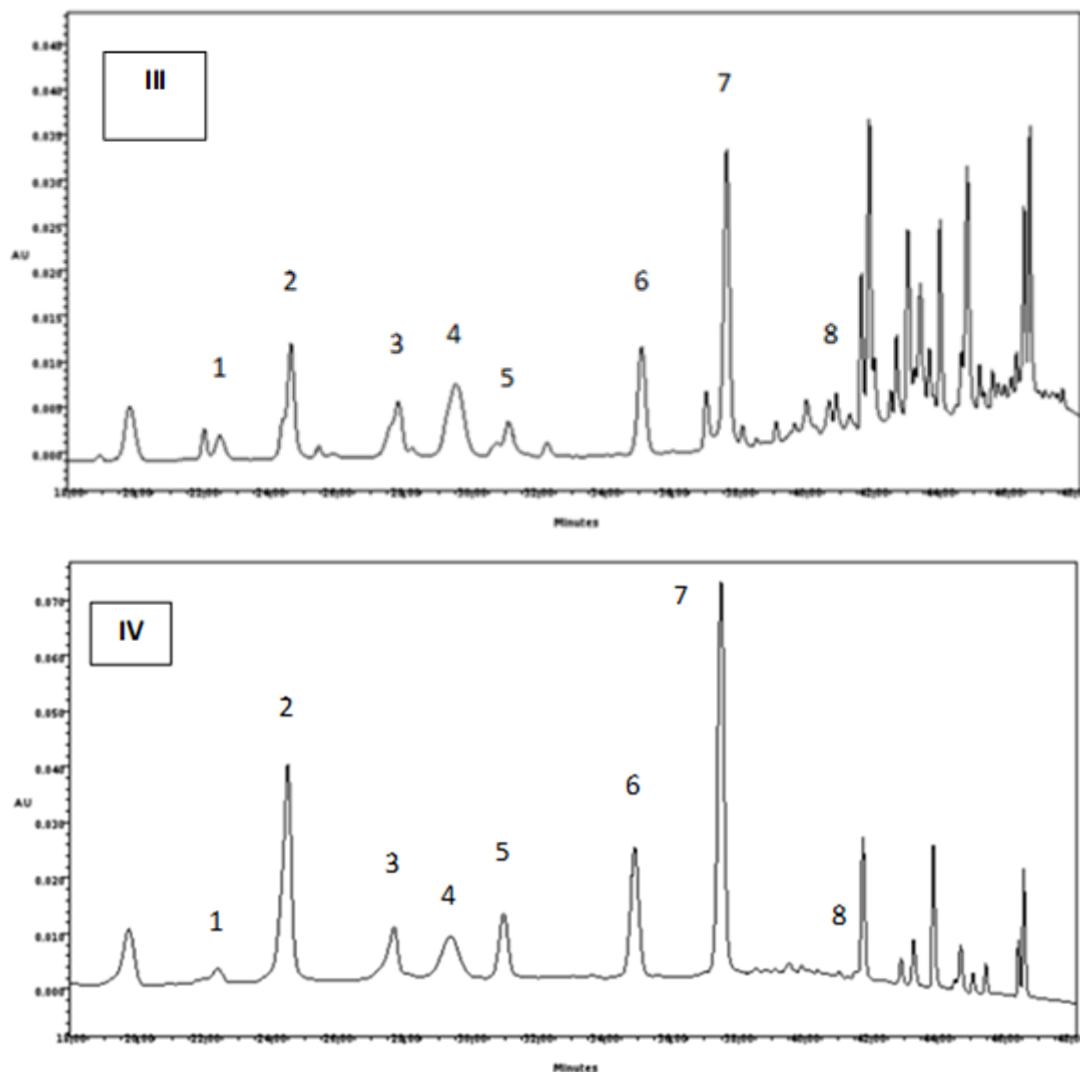
No que diz respeito às antocianinas identificadas nos extratos (Tabela 4), o cloreto de malvidina-3-5-di-O-diglicosídeo correspondeu a antocianina predominante em todos os resíduos (147,61 e 32,55 mg/L; 20,25 e 19,96 mg/L, encontrados nas uvas Magna e Isabel, seco e úmido, respectivamente), dentre as que foram identificadas.

Valores expressivos de cloreto de delphinidina-3-glicosídeo (28,15 mg/L, no resíduo de uva Magna seco) e cloreto de malvidina-3-glicosídeo (17,21 mg/L, no resíduo de uva Isabel úmido) ainda foram encontrados, enquanto que os menores teores foram de cloreto de peonidina-3-O-glicosídeo e de petunidina-3-O-glicosídeo (0,11 e 0,42 mg/L, no resíduo de uva Magna úmido).

Os cromatogramas, oriundos da análise em CLAE, registrados a 520 nm, apresentam o perfil de antocianinas encontradas nestes subprodutos, e estão apresentados nas Figuras 10 e 11.

Figura 10. Cromatogramas (CLAE- DAD, 520 nm) dos extratos antociânicos em fase aquosa obtidos a partir dos resíduos (casca e semente) do processamento de suco integral de uva cv. Isabel e Magna.

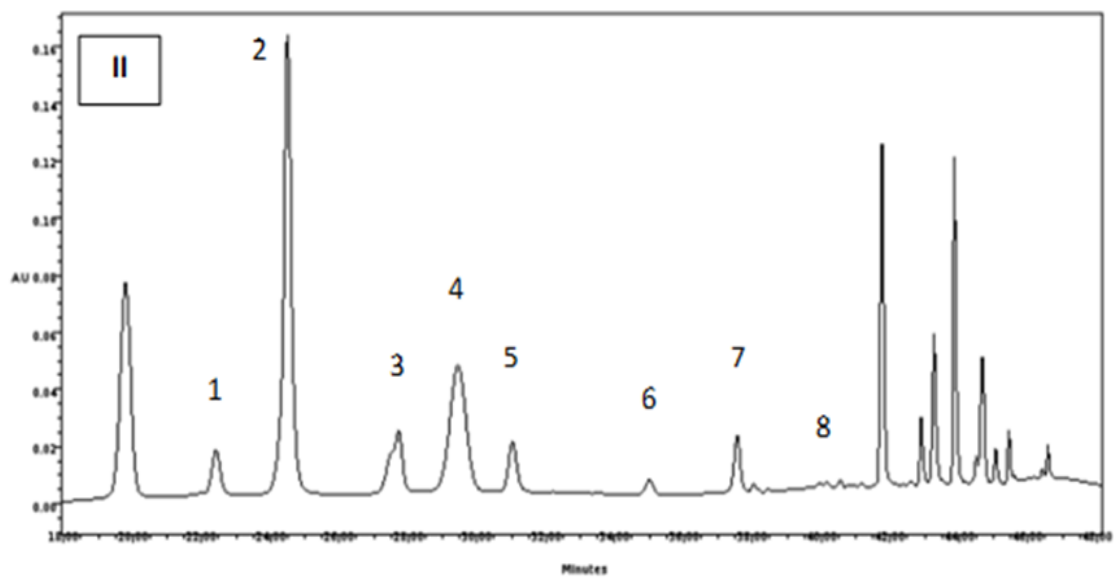
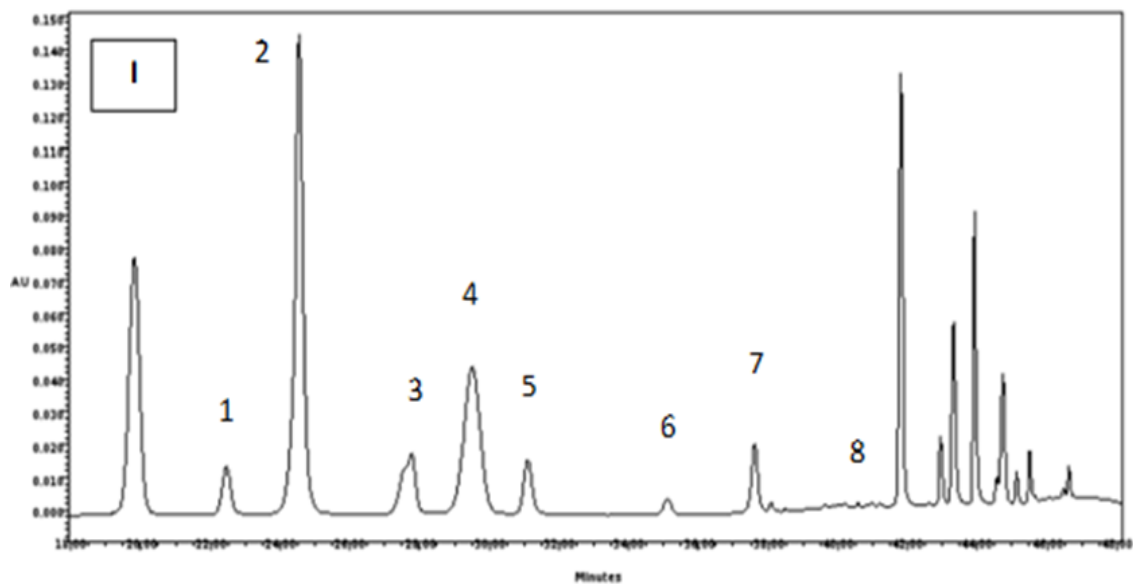


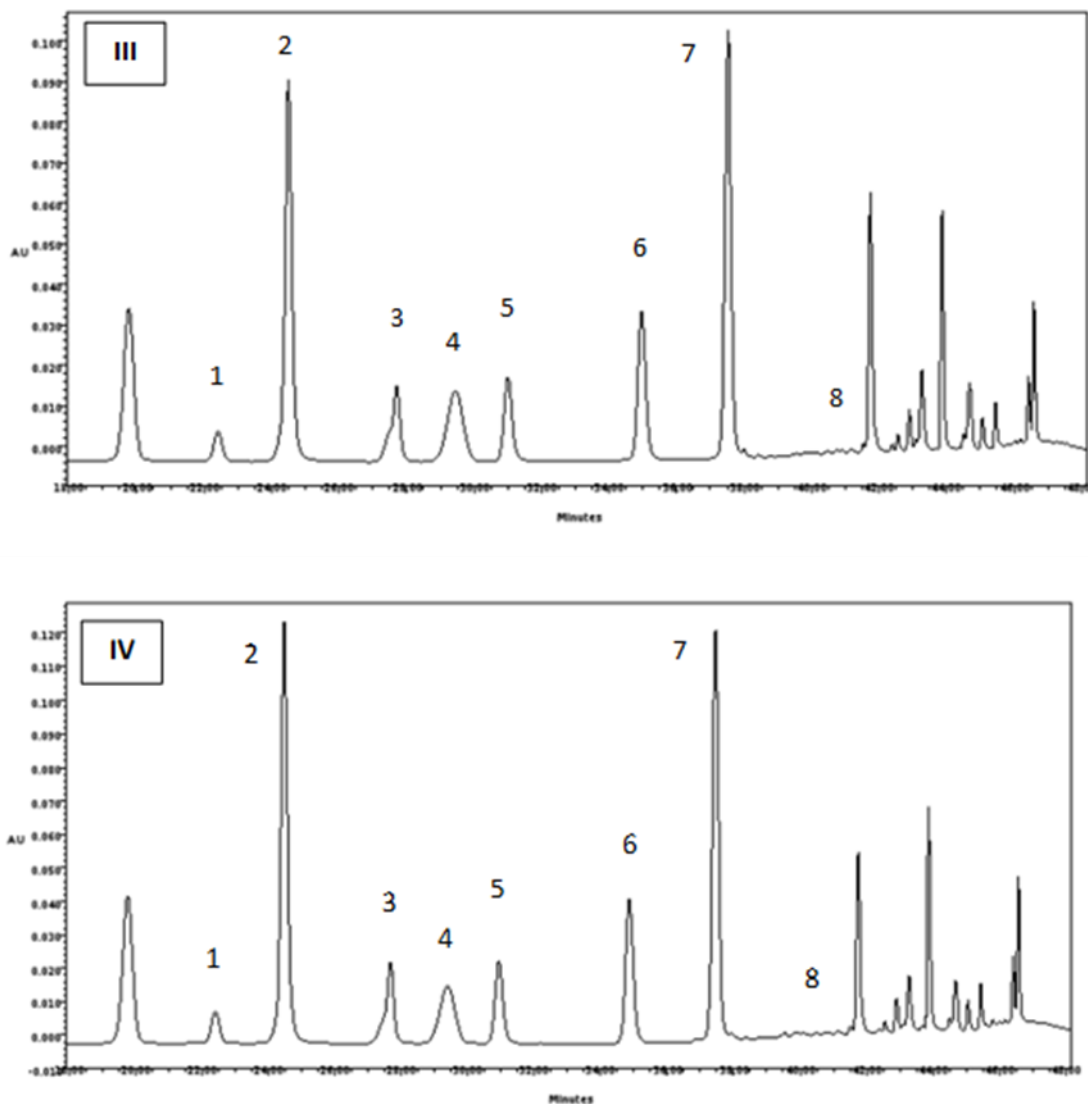


Extratos: I – farinha de resíduo de uva Magna; resíduo úmido de uva Magna; III – farinha de resíduo de uva Isabel; IV - resíduo úmido de uva Isabel.

Antocianinas: 1 – cloreto de cianidina-3,5-diglicosídeo; 2 – cloreto de delphinidina-3-glicosídeo; 3 – cloreto de cianidina-3-glicosídeo; 4 - cloreto de malvidina-3,5-di-O-glicosídeo; 5 - pelargonidina-3-O-glicosídeo; 6 - peonidina-3-O-glicosídeo; 7 - malvidina-3-glicosídeo; 8 - petunidina-3-glicosídeo.

Figura 11. Cromatogramas (CLAE- DAD, 520 nm) das antocianinas purificadas obtidas a partir dos resíduos (casca e semente) do processamento de suco integral de uva cv. Isabel e Magna.





Antocianinas purificadas a partir de: I – farinha de resíduo de uva Magna; resíduo úmido de uva Magna; III – farinha de resíduo de uva Isabel; IV - resíduo úmido de uva Isabel. Antocianinas: 1 – cloreto de cianidina-3,5-diglicosídeo; 2 – cloreto de delphinidina-3-glicosídeo; 3 – cloreto de cianidina-3-glicosídeo; 4 - cloreto de malvidina-3,5-di-O-glicosídeo; 5 - pelargonidina-3-O-glicosídeo; 6 - peonidina-3-O-glicosídeo; 7 - malvidina-3-glicosídeo; 8 - petunidina-3-glicosídeo.

Os resultados obtidos nesta pesquisa vêm reforçar o potencial biológico dos extratos e antocianinas purificadas obtidas a partir dos subprodutos de uvas Magna e Isabel, visto que são ricos em antocianinas, de diferentes constituições químicas. O teor de antocianinas em amostras de resíduos de uva tem sido estudado *via* CLAE, e resultados diversos quanto a este atributo tem sido relatados na literatura.

Embora apresentem unidades de medida diferentes do presente estudo, valores acerca do perfil de antocianinas de frutas escuras e seus resíduos tem

sido divulgados, e evidencia um potencial destas amostras como fonte destes flavonoides bioativos.

Em análise de resíduos fresco e seco de uva cv. Magna, Silva *et al.* (2020) encontraram os mesmos tipos de antocianinas relatadas no presente estudo para esta cultivar, porém em faixas de concentração que variaram de 2,6 a 536,9 mg / kg da amostra.

Peixoto *et al.* (2018), ao avaliarem extrato hidrometanólico de bagaço de uva fermentado (constituído por cascas e sementes, advindo da vinificação), encontraram sete tipos de antocianinas (derivados de malvidina, delphinidina, petunidina e peonidina), porém com valores entre 0,72 e 0,048 µg / g de extrato.

Em avaliação do extrato hidrometanólico de bagaço de mirtilo colombiano (*Vaccinium meridionale* Swartz) liofilizado, Garzón *et al.* (2020) reportaram conteúdo total de antocianinas nestes extratos de 747,6 mg / 100g, com derivados de cianidinina, delphinidina e malvidina, composição esta comum a deste estudo.

A caracterização fitoquímica do extrato etanólico de mirtilo (frutos inteiros) foi realizada por Silva *et al.* (2016), que obtiveram teores de antocianinas totais de 184,7 µg / mg, e assim como no presente estudo, encontraram diferentes derivados glicosilados de delphinidina, cianidinina, malvidina e petunidina, em concentrações que variaram de 4 a 62 µg / mg. Esse estudo ainda revelou que os glicosídeos de malvidina também foram as antocianinas majoritárias na amostra (53,7%).

Em relação as amostras de antocianinas purificadas (Tabela 5), o cloreto de malvidina-3-5-di-O-diglicosídeo destacou-se novamente como a antocianina predominantemente presente em todos os resíduos dentre as que foram identificadas (103,62 e 107,59 mg/L; 40,87 e 40,48 mg/L, de uvas Magna e Isabel, seco e úmido, respectivamente), seguida do cloreto de delphinidina-3-glicosídeo (37,89 e 40,17 mg/L, no resíduo de uva Magna, seco e úmido) e cloreto de malvidina-3-glicosídeo (24,89 e 29,30 mg/L, no resíduo de uva Isabel, seco e úmido).

Ainda na Tabela 5, constata-se que o cloreto de petunidina-3-O-glicosídeo foi a antocianina encontrada em menor quantidade em todos os resíduos avaliados (0,51 e 0,82 mg/L; 0,50 e 0,48 mg/L, de uvas Magna e Isabel, seco e úmido, respectivamente).

Os resultados obtidos estão em conformidade com o que afirma Sirohi *et al.* (2020), que entre os diferentes tipos de antocianinas conhecidas os mais frequentemente presentes, em ordem decrescente, nas cascas de uvas são os 3-O-glicosídeos de malvidina, petunidina, cianidina, peonidina e delphinidina

Estes resultados também corroboram com o estudo de Peixoto *et al.* (2018), que ao analisarem extrato hidrometanólico de bagaço de uva *Vitis vinífera* L. identificaram diferentes compostos antociânicos, porém os derivados de malvidina corresponderam as antocianinas majoritariamente presentes (1,124 µg/ mL).

As diferenças entre os resultados encontrados na literatura e os do presente estudo são justificáveis visto que, segundo Restuccia *et al.* (2017), fatores como área de plantio, safra, tamanho e tipo da fruta analisada exercem influência sobre o conteúdo de antocianinas de uvas e seus subprodutos.

Além disso, Sirohi *et al.* (2020) ressaltam que as antocianinas sofrem interferência de diferentes variáveis, onde entre elas podemos citar a luz, temperatura, pH, oxigênio, presença de íons metálicos e ação de alguns tipos de solventes, e isto influencia em sua quantificação.

A quantificação destas antocianinas glicosiladas corrobora com a afirmação de Khoo *et al.* (2017), de que as antocianidinas malvidina, peonidina e petunidina dificilmente são encontradas em pequenos frutos de cor vermelha e roxa, visto que estão na forma metilada e por esta condição oferecem pouca capacidade de pigmentação vermelha quando comparadas com àquelas sem metilação, sendo assim mais presentes em frutos de tons de coloração azuis.

Estes resultados contribuem para reforçar o potencial biotecnológico dos resíduos analisados, confirmando a presença de antocianinas em sua composição, visto que em diversos casos os extratos polifenólicos precisam ser

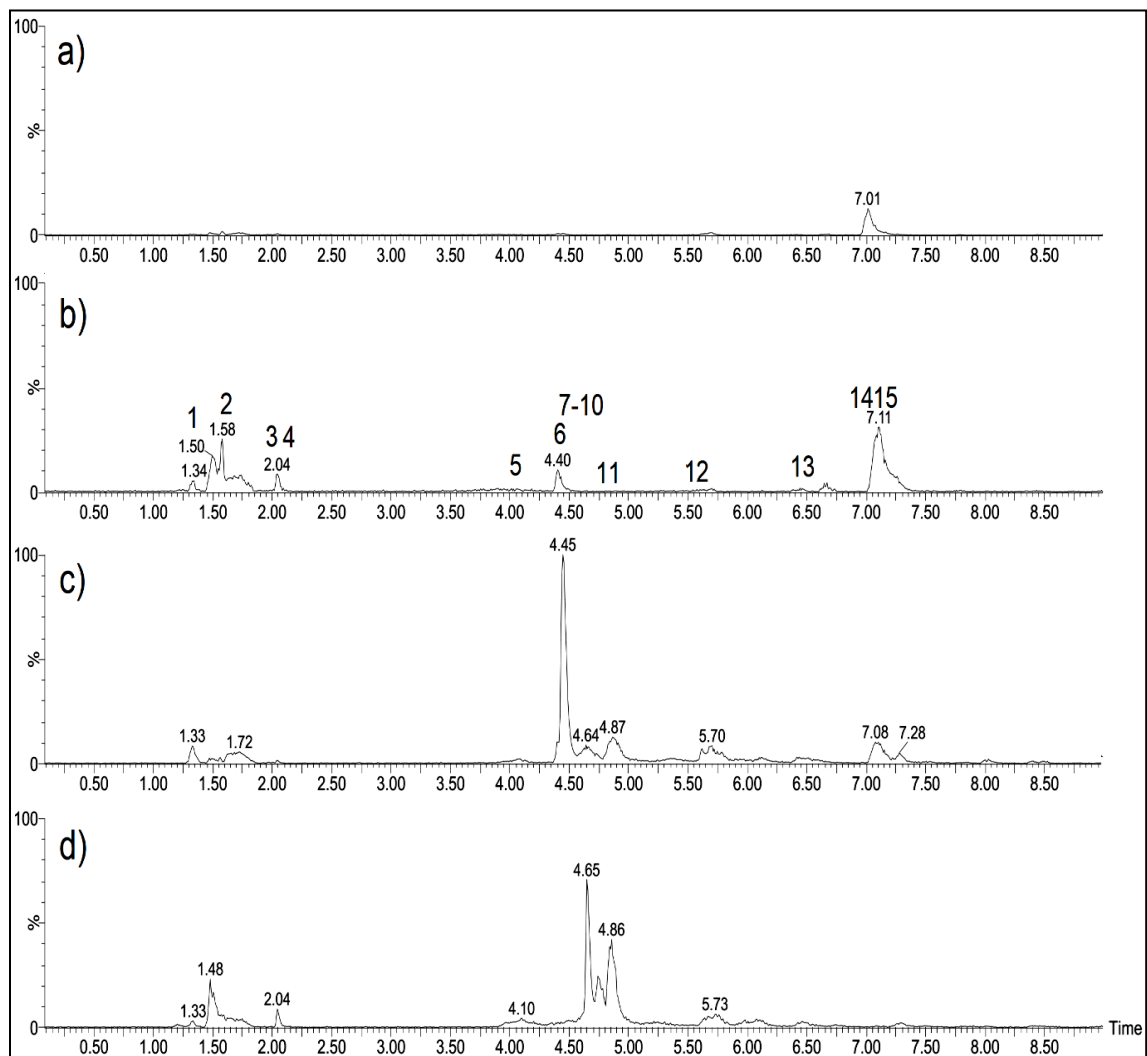
preservados para uso posterior, e para permitir isto, bem como evitar efeitos negativos associados ao armazenamento, a estocagem do extrato seco representa vantagens como maior estabilidade de fitoquímicos ativos e menores custos de armazenamento, além de versatilidade para serem processados visando o isolamento e purificação de compostos ou ainda para serem integrados, em concentrações precisas, na elaboração e desenvolvimento de novos produtos funcionais, como por exemplo alimentos ou cosméticos (MACHADO E DOMÍNGUEZ-PERLES, 2017).

4.2.2. Análises espectrométricas

As análises espectrométricas no presente estudo foram realizadas para a caracterização de substâncias que não puderam ser identificadas nas análises cromatográficas, por comparação dos tempos de retenção com padrões e espectros de UV-visível.

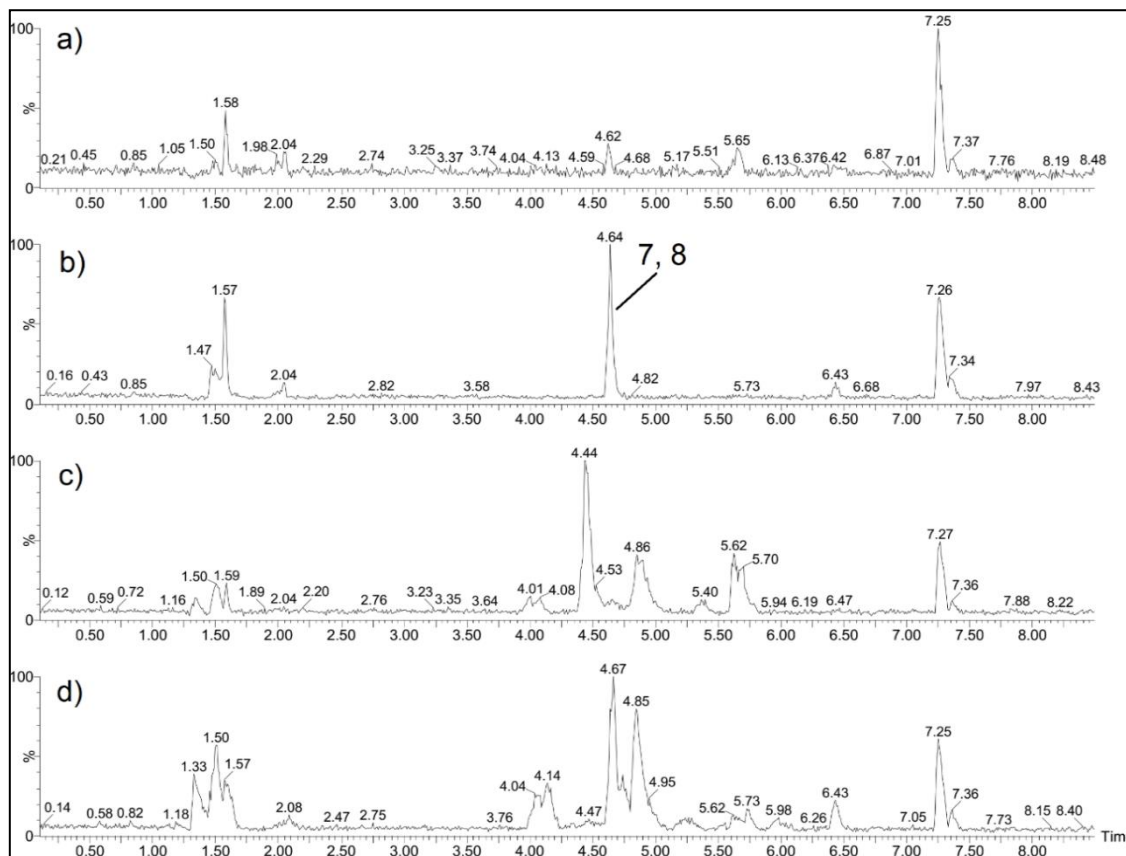
A identificação de compostos fenólicos e antociânicos é tradicionalmente realizada por ESI em modo positivo, porém de acordo com Ongkowijoyo *et al.* (2018) a diferenciação desses compostos é mais eficaz quando se utiliza o modo negativo. Na Figura 12 e 13 estão disponíveis os cromatogramas por intensidade do pico base (BPI) (modo negativo e positivo, respectivamente) dos extratos antociânicos em fase aquosa obtidos a partir dos resíduos (casca e semente) do processamento de suco integral de uva cv. Isabel e Magna *via* QTOF-MS.

Figura 12. Cromatogramas por intensidade do pico base (BPI) (modo negativo) dos extratos antociânicos em fase aquosa obtidos a partir dos resíduos (casca e semente) do processamento de suco integral de uva cv. Isabel e Magna *via* QToF-MS.



Extratos: a - resíduo úmido de uva Magna; b - resíduo úmido de uva Isabel; c - farinha de uva Magna; d - farinha de uva Isabel.

Figura 13. Cromatogramas por intensidade do pico base (BPI) (modo positivo) dos extratos antociânicos em fase aquosa obtidos a partir dos resíduos (casca e semente) do processamento de suco integral de uva cv. Isabel e Magna *via* QToF-MS.



Extratos: a - resíduo úmido de uva Magna; b - resíduo úmido de uva Isabel; c - farinha de uva Magna; d - farinha de uva Isabel.

Na Tabela 6 podem ser visualizados os dados espectrométricos dos compostos identificados acerca dos compostos identificados nos extratos antociânicos em fase aquosa obtidos a partir dos resíduos (casca e semente) do processamento de suco integral de uva cv. Isabel e Magna *via* QToF-MS.

Tabela 6. Dados qualitativos dos compostos identificados nos extratos antociânicos em fase aquosa obtidos a partir dos resíduos (casca e semente) do processamento de suco integral de uva cv. Isabel e Magna *via* QToF-MS.

Substância (nº)	Tr (min)	Modo (Íon)	[M-H] ⁻ (m/z)	[M-H] ⁻ calculado (m/z)	Fragmentos de Ions (m/z)	Fórmula molecular	Nome atribuído	Extratos de resíduo de uva			
								Farinha de uva Isabel	Farinha de uva Magna	Resíduo úmido de uva Isabel	Resíduo úmido de uva Magna
1	1,48	-	341,1084	341,1084	179	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Sacarose	x	x	x	-
2	1,58	-	149,0091	149,0086	-	C ₄ H ₆ O ₆	Ácido Tartárico	x	x	x	x
3	2,04	-	169,0135	169,0137	125	C ₇ H ₆ O ₅	Ácido Gálico	x	x	x (q.z.)	x (q.z.)
4	2,06	-	657,1627	657,1608	323	C ₃₅ H ₂₉ O ₁₃	Desconhecido	x	x	x	x
5	4,10	-	577,1356	577,1346	451, 425, 407, 289	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Dímero de Procianidina B	x	x	-	-

6	4,45	-	289,0709	289,0712	245	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Catequina	x	x	x	x
7	4,64	+	463,1243	463,1240	301	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁	Peonidina 3-O-glicosídeo	x	x	x	x
8	4,66	+	493,1347	493,1346	331	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂	Malvidina 3-O-glicosídeo	x	x	x	x
9	4,68	-	865,1965	865,1980	739, 577, 425, 407, 289	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	Trímero de Procianidina B	x	x	x (q.z.)	x (q.z.)
10	4,74	-	865,2002	865,1980	739, 577, 425, 407, 289	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	Trímero de Procianidina B	x	x	x (q.z.)	x (q.z.)
11	4,86	-	289,0714	289,0712	245	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Epicatequina	x	x	-	-
12	6,07	-	477,0679	477,0669	301, 300	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	Quercetina O-glicuronídeo	x	x	x (q.z.)	x (q.z.)
13	6,46	-	577,1358	577,1346	451, 425, 407, 289	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Dímero de Procianidina B	x	x	x (q.z.)	x (q.z.)
14	7,08	-	207,0138	207,0141	143	C ₆ H ₈ O ₈	Desconhecido	x	x	x	x

15	7,28	-	315,0860	315,0869	-	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	Desconhecido	x	x	-	-
----	------	---	----------	----------	---	--	--------------	---	---	---	---

Tr – Tempo de retenção; q.z. – quase zero

O cromatograma da substância 1 mostrou o íon $[M-H]^-$ em m/z 341,1084 e sua fragmentação produziu um íon de m/z 179, possivelmente da clivagem da molécula de sacarose, um dissacarídeo, não encontrado apenas no extrato de resíduo úmido de uva Magna. As substâncias 2 e 3 apresentaram massas molares condizentes com 2 tipos de ácidos, correspondentes ao tartárico (íon pseudomolecular de m/z 149,0086) e ao gálico (íon pseudomolecular de m/z de 169,0137, fragmento de íon de m/z 125), ácidos orgânico e fenólico, respectivamente, encontrados em todos os extratos (Figura 13).

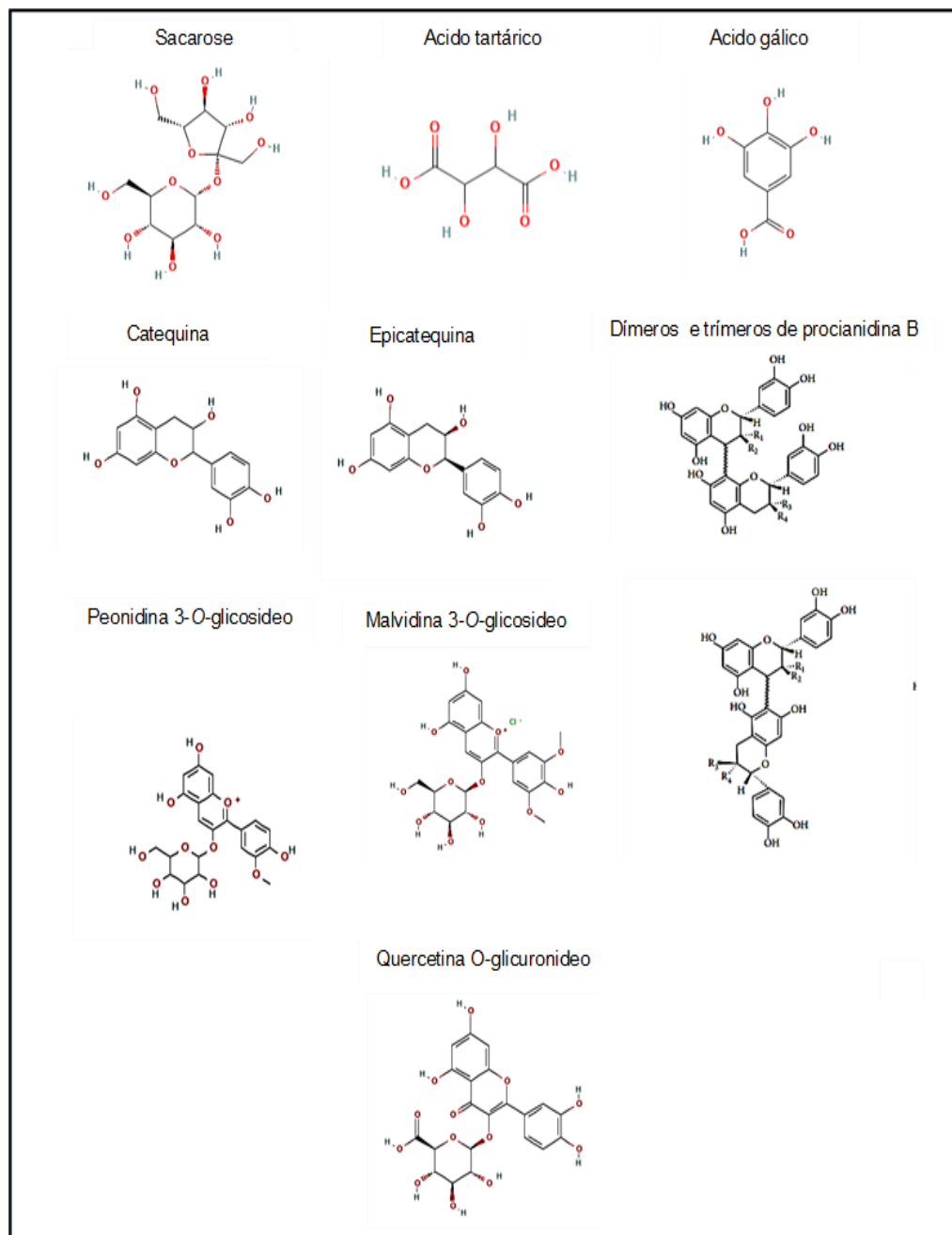
Ainda com base nos dados obtidos nos espectros de massa, flavan-3-óis e seus oligômeros também foram encontrados nas amostras analisadas. O íon precursor $[M-H]^-$ de m/z 577,1346 das substâncias 5 e 13 e os fragmentos observados de m/z 451, 425, 407 e 289 sugeriram que essas substâncias correspondem a dímeros de procianidina B, presentes nos extratos obtidos das farinhas das 2 uvas e em todos os extratos, respectivamente (Figura 13).

A substância 6 (íon pseudomolecular de m/z 289,0712, fragmento de íon de m/z 245) exibiu massa molar condizente com a da catequina; e as substâncias 9 e 10 (íon pseudomolecular de m/z 865,1980) exibiram fragmentos de íon (m/z 739, 577, 425, 407 e 289) correspondentes a trímeros de procianidina B, encontrados em todas as amostras analisadas (Figura 13).

Antocianinas glicosiladas e flavonóis também foram identificados em todos os extratos de resíduo de uva analisados *via* QToF-MS: as substâncias 7,8 e 12 (íon pseudomolecular de m/z 463,1240, 493,1346 e 477,0669, respectivamente) apresentaram fragmentos de íon (m/z 301, 331, e 301 e 300, respectivamente) permitiram chegar a identificação de peonidina 3-O-glicosídeo, malvidina 3-O-glicosídeo e quercetina O-glicuronídeo, respectivamente (Figura 13 e 14).

Na Figura 14 podem ser visualizadas as estruturas químicas dos compostos encontrados nos extratos antociânicos em fase aquosa obtidos a partir dos resíduos (casca e semente) do processamento de suco integral de uva cv. Isabel e Magna *via* QToF-MS.

Figura 14. Estruturas químicas dos compostos encontrados nos extratos antociânicos em fase aquosa obtidos a partir dos resíduos (casca e semente) do processamento de suco integral de uva cv. Isabel e Magna via QToF-MS.



Fonte: Adaptado de Flamini *et al.* (2013); Pubchem (URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.)

Os dados obtidos corroboram com o que afirma Flamini *et al.* (2013), de que dentre os principais tipos de compostos polifenólicos encontrados em uvas estão os flavan-3-óis, tais como a catequina e a epicatequina, e seus oligômeros, a exemplo das procianidinas do tipo B, localizadas nas cascas e sementes do fruto, principais materiais constituintes do resíduo agroindustrial avaliado neste estudo.

Diferentes estudos também têm avaliado frutos e vegetais escuros e seus subprodutos a partir da espectrometria de massas, e encontrado uma variabilidade de compostos orgânicos, dentre eles os compostos fenólicos, incluindo diferentes tipos de antocianinas.

O extrato aquoso de bagaço de uva *Lachryma Christi* (cascas e sementes) foi avaliado por Aguilar *et al.* (2018), e exibiu diferentes compostos bioativos em sua constituição, dentre eles: antocianinas, tais como derivados de peonidina malvidina, delphinidina e petunidina glicosiladas (com íons pseudomoleculares de m/z entre 463 e 535, e os fragmentos de íons de m/z entre 286 e 333); flavonóis, como os derivados de quercetina, miricetina e isorametina (com íons pseudomoleculares de m/z entre 447 e 609, e os fragmentos de íons de m/z entre 151 e 317); ácidos fenólicos, entre eles o gálico e ferúlico (com íons moleculares de m/z de 331 e 355, e os fragmentos de íons de m/z entre 125 e 271); e flavan-3-óis, como a catequina e a epicatequina (com íons moleculares de m/z 289, e os fragmentos de íons de m/z entre 109 e 245).

Amostras de antocianinas purificadas a partir do extrato metanólico de resíduo de uva Merlot advindo da vinificação apresentaram diferentes derivados de peonidina, malvidina, cianidina, pelargonidina, delphinidina e petunidina, pertencentes ao grupo das antocianinas glicosiladas, com valores de m/z entre 463 a 639,1 para os íons moleculares e de 287 a 331,1 para os seus fragmentos (ZHAO *et al.*, 2019).

O extrato etanólico de resíduos advindos da prensagem de mirtilo e groselha para a produção de suco foram analisados por Klavins *et al.* (2018), que registraram diferentes antocianinas glicosiladas, derivadas de peonidina,

malvidina, cianidina, pelargonidina, delphinidina e petunidina, com valores de m/z entre 419,1 a 493,1 para os íons moleculares.

Ao avaliarem extratos metanólicos de morango (polpa, casca e semente), Enomoto *et al.* (2018) observaram a presença de derivados de pelargonidina, delphinidina e cianidina (m/z do íon molecular entre 433,1 a 579,1, e de seus fragmentos entre 271 a 303), além da sacarose (íon molecular de m/z de 381, e os fragmentos de íons de m/z de 201 e 219) e do ácido cítrico (sacarose (íon molecular de m/z de 230,9).

Em análise de amostras de antocianinas purificadas de resíduos de amora advindos da vinificação, Zhang *et al.* (2018) identificaram a presença de cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutinosídeo (m/z de 449 e 287, e de 595 e 287, para o íon molecular e seus fragmentos, respectivamente)

Abdel-Aal *et al.* (2018) ao analisarem extrato etanólico de farelo de trigo roxo, encontraram derivados de peonidina, malvidina, cianidina, pelargonidina, delphinidina e petunidina, com valores de m/z entre 449 a 639 para os íons moleculares e de 271 a 331 para os seus fragmentos.

Os resultados obtidos a partir da espectrometria de massa contribuíram para aprofundar o conhecimento acerca do perfil fitoquímico dos resíduos agroindustriais de uva analisados. Disparidades entre o perfil de compostos fenólicos encontrados no presente estudo frente aos das pesquisas supracitadas são esperados, visto que segundo Klavins *et al.* (2018) a constituição e distribuição destes fitoquímicos nos vegetais é diretamente influenciada pela espécie de planta avaliada, e assim as condições de extração também interferem sobre este conteúdo, e, portanto, devem ser otimizadas individualmente para cada tipo de material vegetal analisado.

Diante disto, apesar de algumas antocianinas previamente identificadas na CLAE-DAD não terem sido detectadas isto pode ter ocorrido em função das diferentes técnicas de análise utilizadas, visto que segundo Ongkowijoyo *et al.* (2018) tal questão ainda representa um problema a ser solucionado, que requer otimização de parâmetros ideais que contribuiriam para aumentar a seletividade de antocianinas e sua estabilidade química.

Ademais, os dados provenientes da espectrometria de massas também contribuem para destacar o potencial biotecnológico dos resíduos agroindustriais de uva Isabel e Magna, pois confirmam a presença de fitoquímicos com potenciais bioativos diversos, dentre eles a atividade antioxidante, nestes subprodutos, corroborando por exemplo com o que observaram Klavins *et al.* (2018), de que os resíduos da prensagem para produção suco de frutos escuros, como mirtilo e groselha, apresentavam diferentes antocianinas em sua composição, inclusive em quantidades superiores a dos frutos inteiros.

4.3 Determinação da atividade antioxidante

Os dados relacionados à capacidade antioxidante dos extratos antociânicos aquosos (EAA) obtidos a partir do resíduo de uva cv. Isabel e cv. BRS Magna estão apresentados na Tabela 7.

Nos extratos obtidos a partir dos resíduos úmidos, os valores referentes a atividade antioxidante foram: para a uva cv. Isabel, de 63 e 85 µg EQ Trolox/ mL frente aos radicais DPPH e ABTS, 120 µg EQ Acido Ascórbico (AA)/ mL para a Capacidade Antioxidante Total (CAT), e 36 µg EQ Ácido gálico (AG)/ mL para o Poder Redutor (PR); e no resíduo de uva cv. Magna foi de 41 e 92 µg EQ Trolox/ mL frente aos radicais DPPH e ABTS, 180 µg EQ AA/ mL para a CAT, e 42 µg EQ AG/ mL para o PR.

Tabela 7. Atividade antioxidante dos extratos antociânicos aquosos (EAA) de resíduo úmido e seco de uva cv. Isabel e cv. Magna, determinada pela capacidade de sequestro dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, Capacidade Antioxidante Total (CAT) e Poder Redutor (PR).

Amostras	DPPH [•] (µg EQ Trolox/ mL de extrato)	ABTS ^{•+} (µg EQ Trolox/ mL de extrato)	CAT (µg EQ AA/ mL de extrato)	PR (µg EQ AG/ mL de extrato)
Resíduo de uva Isabel úmido	63 ± 2,00	85 ± 5,00	120 ± 15,00	36 ± 1,00
Resíduo de uva Isabel seco	153 ± 5,00	107 ± 3,00	220 ± 10,00	139 ± 9,00
Resíduo de uva Magna úmido	41 ± 2,00	92 ± 3,00	180 ± 12,00	42 ± 4,00
Resíduo de uva Magna seco	174 ± 1,00	125 ± 12,00	360 ± 35,00	115 ± 5,00

Valores descritos em média ± desvio padrão (n = 3). DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo radical; ABTS: radical 2',2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato); PR: Poder redutor; CAT: Capacidade Antioxidante Total.

No que diz respeito aos extratos obtidos a partir dos resíduos secos, os valores referentes a atividade antioxidante (Tabela 6) foram: na uva Isabel, de 153 e 107 µg EQ Trolox/ mL frente aos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, 220 µg EQ AA/ mL para a CAT, e 139 µg EQ AG/ mL para o PR; e na uva Magna, de 174 e 125 µg EQ Trolox/ mL frente aos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, 360 µg EQ AA/ mL para a CAT, e 115 µg EQ AG/ mL para o PR.

De acordo com Shimamura *et al.* (2014), maiores valores de TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox) representam um maior potencial de eliminação dos radicais livres. Desta maneira, os valores obtidos nos resíduos

secos de cv. Isabel e Magna, demonstram que estes subprodutos oriundos da produção de suco de uva possuem compostos bioativos, dentre eles as antocianinas que são comuns em resíduos de uvas, que apresentam capacidade antioxidante, frente a diferentes métodos de avaliação.

Isto corrobora com a afirmação de Restuccia *et al.* (2017), acerca de que os compostos fenólicos demonstram diferentes atividades biológicas, em especial a atividade antioxidante, podendo atuar no impedimento da ocorrência de danos oxidativos por parte das biomoléculas, por meio de reações mediadas por radicais livres, interferindo na inibição das reações oxidantes em cadeia oxidante de diversas formas, como a mitigação direta de espécies reativas de oxigênio, inibição de enzimas e quelação de íons metálicos.

A atividade antioxidante dos resíduos secos foi superior à dos extratos obtidos a partir dos resíduos úmidos de uva cv. Isabel e Magna, em todas as metodologias empregadas, o que sugere que o processo de secagem e desidratação potencializa os efeitos antioxidantes destes subprodutos.

De acordo com Chikwanha *et al.* (2018), o tipo de uva e o método de secagem ao qual os seus resíduos são submetidos exercem grande influência no perfil bioativo e nas atividades biológicas destes subprodutos. De acordo com estes autores, a atividade antioxidante sofre ainda influência do conteúdo e da composição fenólica total, que por sua vez são determinadas principalmente pela variedade da uva.

Resultados promissores também foram encontrados frente as análises de Capacidade Antioxidante Total (CAT) e quanto ao Poder Redutor (PR), onde todas os extratos analisados apresentaram atividade antioxidante frente as metodologias avaliadas, com faixas de concentração que variaram de 36 a 360 µg/ mL (em equivalência ao ácido ascórbico e gálico, respectivamente).

Segundo Rubio *et al.* (2016), os testes para avaliar a Capacidade antioxidante Total (CAT) de uma amostra podem ser realizados de forma direta, e tem por princípio básico medir o potencial de inibição da substância frente a processos de oxidação. Ademais, quando o composto é eficaz na redução do molibdênio, há um indicativo de que a amostra exibe atividade antioxidante

elevada, apresentando valores expressivos de CAT (MELO-SILVEIRA *et al.*, 2014)

De acordo com Gaafar *et al.* (2019) e Melo- Silveira *et al.* (2014), o poder redutor demonstrado por compostos fitoquímicos está diretamente ligado à sua eficácia na transferência de elétrons, visto que no ensaio de potência redutora, a atividade antioxidante presente nos extratos da planta enriquece o processo de redução do complexo de ferrocianeto para a forma ferrosa através da doação de elétrons (redução do Fe^{+3} para Fe^{+2}).

Segundo Melo-Silveira *et al.* (2014), quanto maior o PR, maior o potencial de doação de elétrons, e desta forma, a capacidade redutora apresentada pelos extratos analisados evidencia seu potencial antioxidante em ambientes com acidez atenuada, apresentando capacidade de doação de elétrons de átomos de ferro.

A utilização de diferentes ensaios que analisem a atividade antioxidante é extremamente positiva, pois contribui para uma maior aproximação com ambientes e situações que podem ser encontradas em sistemas *in vivo*, e como as metodologias diferem quanto a seus componentes químicos, uma substância pode ser promissora quanto a este potencial em um método, enquanto em outros não (MELO-SILVEIRA *et al.*, 2014).

Os resultados expressivos obtidos para todas as amostras e tipo de ensaios analisados, com destaque para os resíduos secos, trazem à tona mais uma vez o potencial antioxidativo do resíduo agroindustrial de uva.

Extratos ricos em antocianinas e frações desta molécula purificadas tem sido avaliadas quanto à sua atividade antioxidante, usando diferentes parâmetros, dentre eles o que determina a CI_{50} , que conforme descrito por Amico *et al.* (2008), é a concentração de extrato capaz de eliminar 50 % das concentrações iniciais do radical DPPH*, em condições experimentais. O valor de CI_{50} é inversamente proporcional à capacidade antioxidante, ou seja, quanto menores, maior será a atividade antioxidante (GÜL *et al.*, 2013; BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

É importante também a premissa que discorre que a TEAC frente aos radicais DPPH^{*} e ABTS^{**}, conforme parâmetro utilizado neste estudo, pode ser calculada através da razão entre a CI₅₀ do Trolox e da amostra analisada (µg/mL), (SHIMAMURA *et al.*, 2014).

Com base nas afirmativas acima descritas, potenciais antioxidantes menos expressivos foram relatados na literatura, a partir das análises de extratos que apresentam antocianinas em sua composição, mas que, no entanto, vem mais uma vez corroborar para destacar o potencial bioativo deste tipo de amostra.

Em análise dos extratos de resíduos fresco e seco da produção de suco de uva cv. Magna, Silva *et al.* (2020) encontraram maior atividade de sequestro do radical DPPH^{*} para a amostra que não foi desidratada, com CI₅₀ 1,3 e 3,8 µg/mL, respectivamente, um efeito oposto ao do observado no presente estudo.

Ao avaliarem o potencial antioxidante de extratos (água, acetona e etanol como solvente) de bagaço de uva Bordô advindos do processamento de suco e da vinificação, Casagrande *et al.* (2019) identificaram valores de CI₅₀ de 349,03 e 488,92 µg / mL, respectivamente.

Ao analisarem a atividade antioxidante de extratos hidrometanólicos de farinhas de bagaço de uvas tintas cv. Niágara, Máximo, Bordô e Violeta, Monteiro *et al.* (2021) encontraram valores de 255,4, 343,7, 332,9 e 358 mg TEAC/ kg frente ao radical DPPH^{*}, respectivamente, e de 250,2, 401,4, 329,3 e 470,3 mg TEAC / kg em relação ao ABTS^{**}, de forma respectiva.

Em análise de extratos hidroacetônicos da farinha de bagaço de uva cv. Bordeaux proveniente da produção de suco integral, Karnopp *et al.* (2017) disseram que para a análise da capacidade antioxidante através do método DPPH^{*}, obtiveram valores de 1574,26 mg EAA / 100 g da amostra.

A atividade de sequestro do radical DPPH do extrato etanólico das cascas de uva Cabernet Sauvignon oriundas de processo de vinificação foi avaliada por Burčová *et al.* (2019), que encontraram valores de CI₅₀ de 66,78 µg/ mL,

concentração duas vezes maior que a da quercetina, um antioxidante padrão (31,20 µg/ mL).

Peixoto *et al.* (2018), que ao avaliarem extrato hidrometanólico de bagaço de uva fermentado seco (constituído por cascas e sementes, advindo da vinificação), encontraram valores de CI_{50} de 123 e 262 µg/ mL frente ao radical DPPH e o Poder redutor, respectivamente, enquanto que com relação ao Trolox, os resultados foram de 62,98 e 45,71 µg/ml, respectivamente

Balea *et al.* (2018), ao analisarem a capacidade de sequestro do radical DPPH* do extrato etanólico do bagaço de uva Fetească neagră liofilizado, encontraram valores de IC_{50} de 36,99 µg equivalente ao Trolox (TE)/ mL do extrato, e de 11,18 µg/ml para o Trolox. No entanto, de acordo com os autores, este resultado é bastante positivo visto que um composto que apresenta $CI_{50} < 50$ µg TE/mL é considerado detentor de uma atividade antioxidante alta.

A atividade antioxidante de diferentes extratos (aquoso, hidroetanólico e hidroacetônico) de bagaço de uva vermelha cv. Romy desidratado foi avaliada por Gaafar *et al.* (2019), que identificaram que aquele a base de água apresentou os melhores valores de CI_{50} frente ao radical DPPH* e para o PR (2,67 e 59,45 µg/ mL; BHT, 7,61 e 11,01, respectivamente), enquanto que o extrato acetônico apresentou o resultado mais relevante em relação a capacidade de sequestro do radical ABTS** (CI_{50} de 16,32; Trolox, 4,28 µg/mL).

Em estudo com resíduos fermentados desidratados de diferentes tipos de uva (cultivares Merlot, Cabernet Sauvignon, Busuioacă de Bohotin, Fetească Neagră e Traminer), advindos do processo de vinificação, Luchian *et al.* (2019) analisaram a capacidade de sequestro do radical DPPH* de extratos produzidos com estas amostras, obtendo melhores valores de CI_{50} nos extratos etanólicos, entre 20,59 a 34,60 µg/mL, do que para os produzidos com metanol, que apresentaram teores entre 98,142 a 144,9 µg/ mL (CI_{50} de 5,59 e 15,88 para quercetina e BHT, respectivamente).

Uma possível justificativa para tais diferenças entre os autores pode ser atribuída ao uso de diferentes concentrações de fenólicos nos ensaios, e ao fato da intensidade da ação antioxidante destes fitoquímicos estar associada à

estrutura química do composto presente na matéria prima, ou seja, a posição e número de hidroxilas presentes na molécula (LUCHIAN *et al.*, 2019). Vale ressaltar que o conteúdo de fenólicos em uma amostra também pode ter tido influência do processo empregado para a extração destes fitoquímicos (PORTO *et al.*, 2013) e grau de maturação do fruto (MAIEVES *et al.*, 2015).

Na Tabela 8 estão apresentados os dados relacionados à atividade antioxidante das antocianinas purificadas (ACIP) obtidas a partir do resíduo de uva cv. Isabel e cv. BRS Magna.

Tabela 8. Atividade antioxidante das antocianinas purificadas (ACIP) de resíduo úmido e seco de uva cv. Isabel e cv. Magna, determinada pela capacidade de sequestro dos radicais DPPH^{*} e ABTS^{**}, Capacidade Antioxidante Total (CAT) e Poder Redutor (PR).

Amostras (ACIP)	DPPH [*] (mg EQ Trolox /g extrato seco)	ABTS ^{**} (mg EQ Trolox /g extrato seco)	CAT (mg EQ AA/g extrato seco)	PR (mg EQ AG/g extrato seco)
Resíduo de uva Isabel úmido	31.070 ± 250	14.670 ± 10	50.730 ± 910	4.880 ± 240
Resíduo de uva Isabel seco	48.440 ± 200	24.280 ± 170	69.060 ± 1120	6.500 ± 180
Resíduo de uva Magna úmido	33.280 ± 590	16.360 ± 20	61.860 ± 1140	3.720 ± 30
Resíduo de uva Magna seco	44.410 ± 420	22.170 ± 30	72.330 ± 780	5.930 ± 140

Valores descritos em média ± desvio padrão (n = 3). DPPH^{*}: 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo radical; ABTS^{**}: radical 2',2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato); PR: Poder redutor; CAT: Capacidade Antioxidante Total.

Conforme demonstrado na Tabela 8, as antocianinas purificadas obtidas a partir dos resíduos úmidos apresentaram ação antioxidante com valores de: da uva Isabel, de 31070 e 14670 mg EQ Trolox/ mL frente aos radicais DPPH^{*} e

ABTS^{•+}, 50730 mg EQ AA/ mL para a Capacidade Antioxidante Total (CAT), e 4880 mg EQ AG/ mL para o Poder Redutor (PR); e na uva Magna, de 33280 e 16360 mg EQ Trolox/ mL frente aos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, 61860 mg EQ AA/ mL para a CAT, e 3720 mg EQ AG/ mL para o PR.

Em relação as antocianinas purificadas obtidas a partir dos resíduos secos, os valores referentes a atividade antioxidante foram: de 48440 e 24280 mg EQ Trolox/ mL frente aos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, 69060 mg EQ AA/ mL para a Capacidade Antioxidante Total (CAT), e 6500 mg EQ AG/ mL para o Poder Redutor (PR), no que se refere a uva Isabel; e de 44410 e 22170 mg EQ Trolox/ mL frente aos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, 72330 mg EQ AA/ mL para a CAT, e 5930 mg EQ AG/ mL para o PR, no que se refere a uva Magna.

Os resultados encontrados reforçam mais uma vez que a utilização do resíduo de uvas Isabel e Magna é bastante promissora, em função da atividade antioxidante que apresentou ser bastante elevada nos diferentes ensaios utilizados, em especial para as amostras desidratadas, que apresentaram os maiores valores em todas as metodologias utilizadas.

Além de corroborarem para reforçar a importância da utilização de subprodutos de uva, devido ao seu alto poder antioxidante, tais valores demonstram que o processo de secagem dos resíduos potencializa os efeitos anti-oxidativos, das antocianinas purificadas obtidas a partir destas amostras.

O uso de diferentes ensaios para análise da atividade antioxidante neste estudo corrobora com o que relata Han *et al.* (2015), que discorre sobre o fato de que diferentes estimativas, incluindo o valor equivalente do Trolox (TE), têm sido utilizadas com frequência para descrever o potencial antioxidante de alimentos, bebidas e suplementos, em função das dificuldades na medição deste potencial atrelado aos compostos individuais inseridos em uma mistura complexa.

Com base nos parâmetros já discutidos anteriormente, resultados menos promissores que os do presente estudo estão disponíveis na literatura acerca da atividade antioxidante das antocianinas. Ao investigarem a atividade antioxidante da fração de antocianinas purificadas do extrato hidroetanolico do resíduo

proveniente da produção de suco do fruto *Nitraria tangutorum* Bobr. (cascas e sementes), Zhang *et al.* (2017) encontraram valores de CI_{50} de 5,23 e 5,22 $\mu\text{g}/\text{mL}$, frente a capacidade de eliminação do radical DPPH[•] e para o PR, respectivamente (CI_{50} do ácido ascórbico de 5,58 $\mu\text{g}/\text{mL}$), além de CAT de 247,58 mg TE / g de amostra.

Segundo Melo-Silveira *et al.* (2014), resultados significativos acerca da CAT e do PR podem demonstrar que o composto analisado exibe potencial de doação de prótons, bem como pode contribuir para a inibição de radicais livres e para reduzir a iniciação de mecanismos de oxidação celular.

Zhou *et al.* (2020) analisaram a atividade antioxidante de antocianinas purificadas provenientes de extratos *etanólicos* de mirtilo (frutos frescos inteiros), e encontraram valores de CI_{50} de 26,48 e 14,99 $\mu\text{g}/\text{mL}$, com relação às capacidades de sequestro dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, respectivamente (CI_{50} do ácido ascórbico de 62,44 e 18,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$), que apesar de utilizar forma de expressão distinta do presente estudo, contribui para destacar a capacidade antioxidante de antocianinas submetidas a purificação a partir de matérias-primas residuais.

Yang *et al.* (2019), ao estudarem a atividade antioxidante de antocianinas purificadas de frutos inteiros (polpa, casca e sementes) de groselha negra e amora negra silvestre, obtidas a partir de extração *hidroetanólica*, encontraram valores entre 350 – 400 e de ~500 mg TE/ g para a atividade de sequestro do radical DPPH[•], e de ~200 e 200-250 mg TE/ g no que diz respeito ao Poder Redutor das amostras provenientes destes frutos, respectivamente.

Ao analisarem antocianinas purificadas obtidas a partir de frutos secos inteiros de *Lycium ruthenicum* Murray, submetidos a extração *hidroetanólica*, Tang *et al.*, (2017), encontraram valores de EC_{50} de 106,53 e 82,14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a capacidade de sequestro dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, respectivamente, sendo a capacidade antioxidante maior frente ao segundo radical, de acordo com os autores, devido ao hidrofiliismo.

As disparidades entre os resultados deste estudo com os relatados na literatura são esperados, pois além de se tratarem de frutos diferentes, existe o

fato de que os compostos aos quais estão geralmente associadas as atividades antioxidantes apresentada pelas frutas, dentre eles os fenólicos, apresentam variações quanto a concentração e tipo de fitoquímico encontrado, influenciada principalmente por fatores como grau de maturação, condições de plantio e cultivar analisada (FREIRE *et al.*, 2012).

No entanto, o potencial antioxidante das antocianinas purificadas frente a todas as metodologias avaliadas contribui para futura utilização dos subprodutos de uvas cv. Magna e Isabel provenientes da produção de suco, pois segundo Balea *et al.* (2018) a busca pela redução do estresse oxidativo a partir do uso de suplementos obtidos a partir de ervas ou de alimentos funcionais ricos em antioxidantes naturais é bastante atual.

De acordo com Yang *et al.* (2019), as antocianinas apresentam forte potencial antioxidante e de eliminação de radicais livres, e a suplementação do organismo a partir destes compostos traz grandes benefícios a saúde, visto que a poluição ambiental, resíduos de pesticidas e hábitos prejudiciais ocasionam produção de radicais livres em demasia pelo corpo humano, que não são eliminados rapidamente, podendo causar danos a tecidos e células, e ocasionar diferentes tipos de doenças.

Adicionalmente, nos dias atuais, é reconhecido que o valor nutricional de alimentos escuros, como mirtilo, uva roxa e feijão preto, é superior ao de alimentos de cor clara, e ainda apresentam características positivas como boa ação anti-envelhecimento, anti-inflamatória e antibacteriana, além de contribuir para a proteção do sistema cardiovascular e cerebrovascular, com tais fatores atrelados ao alto conteúdo de antocianinas (YANG *et al.*, 2019).

4.4 Atividade antimicrobiana

Os valores referentes a atividade antimicrobiana dos extratos antociânicos aquosos obtidos a partir dos resíduos de uva Isabel e Magna estão apresentados na Tabela 9. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) obtida para estas amostras

foram entre 3 e 6 mg/mL frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes*.

Tabela 9. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos antociânicos aquosos obtidos a partir de resíduos de uva cv. Isabel e Magna.

Cepas	CIM dos extratos antociânicos aquosos dos resíduos de uva (mg/mL)			
	Resíduo de uva cv. Magna seco	Resíduo de uva cv. Magna úmido	Resíduo de uva cv. Isabel seco	Resíduo de uva cv. Isabel úmido
<i>Escherichia coli</i>	5,00	3,00	3,00	3,00
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,00	N.D	N.D	N.D
<i>Salmonella</i>	5,00	3,00	3,00	3,00
<i>Listeria monocytogenes</i>	5,00	3,00	3,00	3,00

N.D. – Não detectado

A análise foi realizada em duplicata. A CIM foi determinada através do método da macrodiluição (mg/mL).

Com base nos resultados acima descritos, foi possível encontrar potenciais antimicrobianos menos relevantes que os do presente estudo, onde concentrações maiores de extratos ricos em antocianinas de frutos diversos foram necessárias para inibir o crescimento de diferentes microrganismos.

Trošt *et al.* (2016), ao avaliarem a atividade antimicrobiana dos extratos hidrometanólicos de bagaços de uvas Pinot Noir e Merlot, encontraram valores de CIM de 6,4 e 8,9 g / L frente a *L. monocytogenes*, de forma respectiva.

Em análise de extratos hidroacetônicos de bagaço de uvas escuras Carbenet Franc e Chambourcin (provenientes da vinificação), Xu *et al.* (2016) encontraram valores de CIM de 4,69 e 18,8 mg/ mL frente a *L. monocytogenes* e de 75 mg /mL em relação ao *S. aureus*.

Peixoto *et al.* (2018) ao avaliarem extrato hidrometanólico de bagaço de uva fermentado (constituído por cascas e sementes, advindo da vinificação), encontraram valores de CIM de 20, 20 e 10 mg/mL frente ao crescimento de *E.coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*, respectivamente.

Diferenças quanto a CIM deste estudo e de outros autores ainda podem ocorrer em função da cultivar analisada visto que, segundo Lima *et al.* (2019), esta característica exerce influência sobre a atividade antimicrobiana de extratos de frutas que apresentam níveis elevados de compostos fenólicos em sua constituição.

As diferenças entre o potencial antimicrobiano dos resíduos avaliados neste estudo e os extratos de diferentes frutos ricos em antocianinas disponíveis na literatura também podem ser justificadas pelo fato de que, em geral, as antocianinas estão localizadas nas organelas intracelulares das plantas, e desta forma, tornam-se disponíveis em função da integridade destas e da ação do solvente utilizado em relação a tais compartimentos. Assim, embora seja necessário considerar a natureza química das antocianinas alvo, a extração destes compostos pode ser facilitada e mais eficiente quando ocorre um pré-tratamento dos tecidos vegetais (SILVA *et al.*, 2017b), fenômeno este ocorrido nos resíduos analisados.

Em análise do extrato hidroetanólico do epicarpo de jabuticaba, Albuquerque *et al.* (2020) observaram que a amostra inibiu o crescimento de diferentes microrganismos, dentre eles *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* resistente à mecilina, com valores de CIM de 20, 10 e 10 mg/mL, respectivamente, valores estes duas ou três vezes maiores do que os relatados no presente estudo.

Resultados mais relevantes que os desta pesquisa também podem ser encontrados, evidenciando a capacidade de extratos que apresentam antocianinas em sua composição de atuarem contra o desenvolvimento de microrganismos. O potencial antimicrobiano do extrato etanólico de mirtilo (frutos inteiros) foi estudado por Silva *et al.* (2016), que identificaram valores de CIM de 500 µg / mL frente ao *S. aureus*.

Em avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidrometanólico de bagaço de mirtilo colombiano (*Vaccinium meridionale* Swartz) liofilizado, Garzón *et al.* (2020) encontraram valores de CI_{50} de 126,14 μg EAG/mL, para *S. aureus*, e de 334, 18 e 528,28 μg EAG/mL para dois tipos de *E. coli* testados (OI57:H7 e ATCC 25922, respectivamente).

Também foi possível verificar que, apesar da maioria dos extratos não apresentarem CIM frente ao *Staphylococcus aureus*, eles exibiram percentuais de inibição frente a este microrganismo, de forma dependente da concentração, com valores entre 7,5 a 89,3% (3 a 6 mg/mL da amostra), conforme descrito na Tabela 10.

Tabela 10. Percentual de inibição do crescimento de *S. aureus* dos extratos antociânicos aquosos obtidos a partir de resíduos de uva cv. Isabel e Magna.

		Percentuais de inibição do crescimento obtidos a partir dos extratos antociânicos aquosos dos resíduos de uva (%)			
Cepas	Concentrações (mg/ mL)	Resíduo de	Resíduo de	Resíduo de	Resíduo de
		uva cv. Magna seco	uva cv. Magna úmido	uva cv. Isabel seco	uva cv. Isabel úmido
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,0	100,0	89,3	57,1	53,3
	5,0	41,9	60,0	55,3	42,8
	4,0	7,5	54,4	38,8	38,1
	3,0	0,0	46,2	25,2	30,1

A análise foi realizada em duplicata. O percentual de inibição foi determinado através do método da macrodiluição (mg/mL).

Estes dados quanto ao *S. aureus* são bastante promissores visto que, segundo Alvarez-Martinez *et al.* (2020), este microrganismo é associado a taxas elevadas de resistência a diversos antibióticos, além de estar repetidamente correlacionado a infecções de demasiada gravidade.

Os valores referentes a atividade antimicrobiana, com base na Concentração Inibitória Mínima (CIM) das antocianinas purificadas (ACIP) obtidas a partir dos resíduos de uva cv. Isabel e cv. Magna estão disponíveis na Tabela 11. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) obtida para estas amostras foram entre 3 e 4 mg/mL frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*, o que indica que as ACIP a partir de todos os resíduos analisados exibem potencial antimicrobiano frente a bactérias Gram positivas e negativas testadas.

Tabela 11. Concentração Inibitória Mínima (CIM) das antocianinas purificadas (ACYP) obtidas a partir de resíduos de uva cv. Isabel e Magna.

Cepas	CIM das ACIP dos resíduos de uva (mg/mL)			
	ACIP	ACIP	ACIP	ACIP
	Resíduo de uva cv. Magna seco	Resíduo de uva cv. Magna úmido	Resíduo de uva cv. Isabel seco	Resíduo de uva cv. Isabel úmido
<i>Escherichia coli</i>	3,00	3,00	4,00	4,00
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,00	3,00	4,00	4,00
<i>Salmonella</i>	4,00	4,00	3,00	4,00
<i>Listeria monocytogenes</i>	4,00	4,00	4,00	4,00

A análise foi realizada em duplicata. A CIM foi determinada através do método da macrodiluição (mg/mL).

Valores mais promissores quanto a CIM de antocianinas purificadas a partir de diferentes frutos, e não de resíduos, foram relatados na literatura. No entanto, além de evidenciarem o potencial antibacteriano das antocianinas, a superioridade destes resultados pode ser justificada pelo fato de que o presente trabalho utiliza um subproduto do processamento de suco de uva que, segundo Haas *et al.* (2020), apesar de apresentar uma quantidade elevada de compostos fenólicos, muitos destes são transferidos para a bebida produzida.

Frações de antocianinas purificadas a partir do extrato metanólico de mirtilo foram analisadas por Sun *et al.* (2018b), que obtiveram valores de CIM de 0,27, 0,53 e 0,21 mg / mL para os microrganismos *L. monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* e *S. aureus*, respectivamente.

Antocianinas purificadas a partir de extrato aquoso de frutos de *Aronia melanocarpa* desidratados foram avaliados por Denev *et al.* (2019), quanto a sua atividade antimicrobiana, e as frações purificadas com 40% de antocianinas, apresentaram CIM de 1,25 , 0,32 e 0,16 mg/mL para as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Staphylococcus aureus* ATCC 25093 e *Proteus vulgaris* G, respectivamente.

Ao investigarem a atividade antibacteriana de antocianinas purificadas e de 5 monômeros isolados de antocianinas baseadas em peonidina a partir de extrato de batata doce roxa, Sun *et al.* (2018a) encontraram valor de CIM de 0,50 e entre 0,25 a 0,75 mg/ mL, respectivamente, frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*.

Em vista do fato de que a resistência a antibióticos é um problema atual de saúde pública, com tendência de crescimento em escala global, aliado a questão de que há poucas alternativas para o tratamento de doenças causadas por bactérias de alta gravidade (ÁLVAREZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2020), os resultados obtidos neste estudo acerca da atividade antimicrobiana, para os extratos e antocianinas purificadas a partir dos resíduos de uva cv. Isabel e Magna, mostram-se promissores quanto ao aproveitamento destes subprodutos na resolução de problemas relacionados à manutenção da saúde humana.

4.5 Atividade citotóxica

Os resultados obtidos acerca do percentual de inibição do crescimento celular (CI%) dos extratos antociânicos aquosos, na concentração inicial de 300 µg/mL, obtidos a partir de resíduos de uva cv. Isabel e Magna em linhagens celulares cancerígenas e não cancerígenas, após 72 h de incubação, estão descritos na Tabela 12.

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico dos extratos, com base nas categorias descritas por Almeida *et al.* (2014), que discorrem que o composto é considerado: sem atividade, com CI% <1%; de pouca atividade, com CI% entre 1 e 50 %; atividade moderada, com CI% entre 50 e 75 %; e de alta atividade, com CI % entre 75 e 100 %.

Os resultados obtidos demonstraram que nenhum dos extratos apresentou efeito inibitório frente as células cancerígenas MCF-7. Também foi possível observar que o extrato do resíduo de uva cv. Isabel seco apresentou atividade citotóxica moderada frente a linhagem HeLa, com percentual de inibição do crescimento de 65,83%. No entanto é importante destacar que este mesmo extrato não inibiu a linhagem de células não cancerígena L929.

No que diz respeito a L929, os extratos de resíduos úmidos de uva Magna e Isabel apresentaram pouca atividade citotóxica (10,99 e 7,79%, respectivamente), fenômeno este comum a todos as substâncias analisadas no que diz respeito a Vero, outra linhagem não cancerígena avaliada (percentuais de 11,89 a 29,19%).

Diante do exposto, é possível observar que os extratos analisados não foram tóxicos frente as linhagens não tumorais avaliadas, o que pode contribuir positivamente para sua utilização em diferentes segmentos industriais, como de fármacos, cosméticos e alimentos.

Tabela 12 - Percentual de inibição do crescimento celular (CI %) dos extratos antociânicos aquosos (300 µg/ml) obtidos a partir de resíduos de uva cv. Isabel e Magna em linhagens celulares cancerígenas e não cancerígenas (72 h de incubação).

Linhagens celulares cancerígenas e não cancerígenas	Percentual de inibição dos extratos antociânicos aquosos dos resíduos de uva (CI % ± EPM %)				
	Resíduo de uva cv. Magna seco	Resíduo de uva cv. Magna úmido	Resíduo de uva cv. Isabel seco	Resíduo de uva cv. Isabel úmido	Paclitaxel
HeLa	27,44 ± 2,03	24,73 ± 2,12	65,83 ± 2,17	7,41 ± 0,41	96,38 ± 0,58
MCF-7	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	25,3 ± 1,05	89,4 ± 0,23
L929	0,00 ± 0,00	10,99 ± 0,45	0,00 ± 0,00	7,79 ± 0,21	95,13 ± 1,11
Vero	25,85 ± 0,39	13,62 ± 1,46	29,19 ± 2,04	11,89 ± 1,07	94,43 ± 0,28

Paclitaxel: fármaco padrão, a 10 µg/mL; EPM %: Erro Padrão Médio da CI%; Potencial citotóxico: sem atividade, com CI% <1%; de pouca atividade, com CI% entre 1 e 50 %; atividade moderada, com CI% entre 50 e 75 %; e de alta atividade, com CI % entre 75 e 100 %.

Estudos tem demonstrado o potencial citotóxico de extratos ricos em antocianinas frente a diferentes tipos de cânceres. Em análise de acerca da atividade citotóxica de sedimento sem bagaço liofilizado (gerado após a centrifugação do suco de uva, durante sua clarificação) de uvas cv. Bordô e Isabel (200 µg/mL), Haas *et al.* (2020) verificaram que estes resíduos não apresentaram percentuais de inibição da viabilidade celular significativos frente a diferentes linhagens de adenocarcinoma gástrico humano (ACP02 e ACP03).

Estes subprodutos, de acordo com os autores supracitados, foram capazes de atuar contra a proliferação de células de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2), onde os níveis de sua viabilidade celular atingiram percentuais 86,04 e 79,38% (500 µg/mL, DMSO a 0,05%), respectivamente.

O desenvolvimento das linhagens de células HeLa foi reduzido quando submetidas a extratos derivados da uva *Arcaç* e suas sementes, cascas, bagaços e vinho (fonte de antocianinas), sendo esta diminuição maior no primeiro extrato, sugerindo que esta redução é dependente da origem do extrato e em função do impacto negativo na síntese de proteínas e mitose, bem como da diminuição da viabilidade celular (NECHITA *et al.*, 2012).

Extratos de lentilha preta, sorgo e uva vermelha (1 e 2,5 mg / mL) apresentaram porcentagens de inibição significativas (62,2%, 52,9% e 35,2%, respectivamente) contra células de câncer de cólon humano (HCT-116) e também para HT-29 (87,5 %, 84,3% e 83,3%, de forma respectiva), mas os autores destacaram que outros compostos além das antocianinas presentes no extrato também podem estar associados a esse efeito (MAZEWSKI *et al.*, 2018).

Em um estudo focado no tratamento de células de câncer de cólon humano (SW480) com extratos de batata-doce "P40" roxa, ricos em antocianina (concentração de 0 - 40 μ M equivalente a peonidina 3-glicosídeo, por 48 h), Lim *et al.* (2013) observaram uma diminuição dependente da dose na viabilidade celular. Segundo os autores, isso mostra que a presença de antocianinas aciladas no extrato ou mesmo uma possível sinergia com outros metabólitos pode ter causado esse efeito.

O potencial citotóxico do extrato de uva Isabel avaliado neste estudo, detentor de antocianinas em sua composição, ocorre em consonância ao que discorre Kochling *et al.* (2013), acerca de que estes flavonoides são compostos fenólicos amplamente disponíveis em frutas e vegetais, e têm ampla atividade biológica, incluindo ação antimutagênese e anticarcinogênese, mecanismos que contribuem para atividade anticâncer. Importante também destacar que tais autores sugerem que a maior atividade antileucêmica apresentada pelo extrato rico em antocianinas é baseada na atividade sinérgica de diferentes antocianinas ou pró-antocianidinas, em vez de uma única substância.

Os resultados acerca do percentual de inibição do crescimento celular (CI %) das antocianinas purificadas obtidas a partir de resíduos de uva cv. Isabel e Magna, na concentração inicial de 200 μ g/mL, em linhagens celulares

cancerígenas e não cancerígenas após 72 h de incubação, estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13. - Percentual de inibição do crescimento celular (CI %) das antocianinas purificadas (ACIP, 200 µg/ml) obtidas a partir de resíduos de uva cv. Isabel e Magna em linhagens celulares cancerígenas e não cancerígenas (72 h de incubação).

Linhagens celulares cancerígenas e não cancerígenas	Percentual de inibição das ACIP dos resíduos de uva (CI % ± EPM %)				
	ACIP Resíduo de uva cv. Magna seco	ACIP Resíduo de uva cv. Magna úmido	ACIP Resíduo de uva cv. Isabel seco	ACIP Resíduo de uva cv. Isabel úmido	Paclitaxel
HeLa	74,14 ± 6,59	71,39 ± 2,14	71,93 ± 0,97	78,37 ± 1,38	96,38 ± 0,58
MCF-7	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	97,27 ± 0,07
L929	21,78 ± 0,74	0,00 ± 0,00	61,69 ± 4,47	69,14 ± 4,18	95,13 ± 1,11
Vero	42,49 ± 1,47	27,92 ± 0,40	57,24 ± 2,93	68,87 ± 6,16	94,43 ± 0,28

Paclitaxel: fármaco padrão, a 10 µg/mL; EPM %: Erro Padrão Médio da CI%; Potencial citotóxico: sem atividade, com CI% <1%; de pouca atividade, com CI% entre 1 e 50 %; atividade moderada, com CI% entre 50 e 75 %; e de alta atividade, com CI % entre 75 e 100 %.

As antocianinas purificadas a partir do resíduo úmido de uva Isabel exibiram alta atividade citotóxica (78,37 %) frente a linhagem cancerígena HeLa, enquanto que para as antocianinas obtidas a partir dos demais resíduos essa atividade foi considerada moderada, porém apresentando percentuais acima de 70%. Assim como observado para os extratos, as antocianinas purificadas não inibiram o crescimento de células da linhagem cancerígena MCF-7.

Cabe ressaltar que para a linhagem de células Vero, que não são cancerígenas, as antocianinas purificadas obtidas a partir dos resíduos de uva Magna seco e úmido apresentaram pouca atividade (42,49 e 27,92 %, respectivamente), enquanto que as obtidas a partir dos resíduos de uva Isabel seco e úmido exibiram atividade moderada tanto para esta linhagem quanto para

a de L929, outra não-cancerígena (57,2 e 68,87; 61,69 e 69,14%, respectivamente).

Em análises realizadas com cianidina 3-glicosídeo proveniente de amoras, Cho *et al.* (2017) constataram que houve aumento da morte celular das células de câncer de mama (MDA-MB-453), de forma dependente do tempo e da dose, com maiores níveis de citotoxicidade na concentração de 200 µg / mL em 72 horas, atingindo percentuais de viabilidade celular abaixo de 60 % quando comparados ao tratamento de 48 h.

O extrato contendo uma mistura de 17 antocianinas purificadas de mirtilos (*Vaccinium myrtillus*) e groselha preta (*Ribes nigrum*) induziu uma redução significativa dependente da dose na proliferação de células cancerosas Caco-2, reduzindo a quantidade de células viáveis em concentrações entre 50 - 500 µg / mL em 24 h e 48 h de tratamento (ANWAR *et al.*, 2016).

Diante dos resultados obtidos a partir do percentual de inibição até o presente momento, foram selecionados para determinação da CI_{50} somente as linhagens de células que apresentaram inibição maiores ou iguais a 65%. Os valores obtidos de CI_{50} para estes compostos estão representados na Tabela 14.

Tabela 14 - Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) e intervalo de confiança (CI 95%) dos extratos antociânicos aquosos e antocianinas purificadas obtidos a partir de resíduos de uva cv. Isabel e Magna em linhagens celulares cancerígenas e não cancerígenas (72 h de incubação).

Amostras	Linhagens celulares cancerígenas e não cancerígenas	
	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) /Intervalo de confiança	
	HeLa	Vero
Antocianinas purificadas de resíduo úmido de uva cv. Isabel	74,4 (61,34 \pm 90,25)	136,2 (112,10 \pm 165,40)
Paclitaxel	0,10 (0,05 \pm 0,16)	4,75 (3,99 – 5,67)

Paclitaxel: fármaco padrão, a 10 $\mu\text{g/mL}$

Os dados obtidos no presente estudo demonstraram que as antocianinas purificadas a partir do resíduo úmido de uva Isabel exibiram valores de CI_{50} menores frente a linhagem cancerígena HeLa (Adenocarcinoma de cérvix humana) do que para a Vero (rim de macaco verde africano), uma linhagem não cancerígena, com resultados de 74,4 e 136,2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Estes resultados ressaltam o maior potencial citotóxico deste subproduto frente as células deste tipo de câncer de cólon, ao passo que exibe menor citotoxicidade para as células normais.

Resultados menos expressivos acerca da CI_{50} (concentração da amostra que inibe 50% do crescimento em relação ao controle) de extratos e antocianinas obtidas a partir de diferentes vegetais frente à linhagens cancerígenas diversas podem ser encontrados na literatura vigente.

Peixoto *et al.* (2018), ao analisarem a atividade citotóxica do extrato hidrometanólico (8mg / mL) de bagaço de uva fermentado seco (constituído por

cascas e sementes, advindo da vinificação), encontraram valores de CI_{50} de 352 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem MCF-7 e maior que 400 $\mu\text{g/mL}$ para as células de HeLa, NCI-H460 (carcinoma de pulmão humano) e HepG2 (carcinoma hepatocelular humano).

Albuquerque *et al.* (2020) ao avaliarem extrato hidroetanólico do epicarpo da jaboticaba, identificaram atividade antiproliferativa frente as linhagens de células HeLa e MCF-7, com CI_{50} de 278 e 300 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O potencial citotóxico do extrato etanólico produzido a partir bagaço de uva liofilizado foi avaliado por Milutinović *et al.* (2019), que encontraram valores de CI_{50} acima de 500 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem de adenocarcinoma de colón humano (SW-480), após 24h e 72h de tratamento.

Ombra *et al.* (2016) realizaram um estudo que identificou a presença de antocianinas em feijão, e como resultado as espécies Zampognaro (Z) e Nero di Caposele (NC) que não foram submetidas ao cozimento, demonstraram atividade de inibição da proliferação celular em células de: câncer de mama humano (MCF-7), com CI_{50} de 185,44 e 119,02 μg de EAG / mL; adenocarcinoma de pulmão humano (A549), com CI_{50} de 177,96 e 118,3 μg GAE / mL; e adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2), com CI_{50} de 49,85 e 73,53 μg GAE / mL, respectivamente.

Guimarães *et al.* (2013) demonstraram que o extrato enriquecido com antocianina (EA) obtido das espécies *Arbutus unedo*, *Prunus spinosa*, *Rosa micrantha* e *Rosa canina* exibiu atividade antineoplásica contra linhagem tumoral humana de adenocarcinoma do colo do útero (HeLa), e nenhum efeito citotóxico contra células não tumorais, como proteína proteolipídica 2 (PLP2) em diferentes concentrações (variando de 400 - 25 $\mu\text{g/mL}$), com CI_{50} entre 149 a > 400 $\mu\text{g/mL}$ para estes tipos de extratos.

No entanto, os autores acima referidos também relatam que o extrato enriquecido com composto fenólico não antociânicos (EF) obtido das espécies estudadas apresentou melhores taxas de inibição em relação às linhagens tumorais testadas. Os compostos fenólicos são conhecidos por ter uma potente

atividade antioxidante, que está associada ao potencial anticancerígeno do EF (GUIMARÃES *et al.*, 2013).

Os efeitos das antocianinas da fruta *L. caerulea* 'Beilei' na proliferação de células de hepatocarcinoma humano (SMMC-7721) foram estudados por Zhou *et al.* (2018), onde a cianidina-3-glicosídeo apresentou o maior efeito antiproliferativo nessas células (sendo a antocianina em maior quantidade no extrato), atingindo valores de CI_{50} menores que 0,2 mg / mL

Desta forma, os resultados obtidos acerca do potencial anticâncer dos extratos e antocianinas purificadas obtidos a partir dos resíduos de uvas Isabel e Magna podem ser considerados bastante relevantes, visto que segundo Haas *et al.* (2020), a utilização de polifenóis tem se apresentado como uma forte tendência quanto à seu uso na prevenção de doenças, e em conformidade com este fenômeno, a extração destes compostos bioativos a partir de resíduos industriais se mostra como uma alternativa sustentável, tanto no âmbito econômico como ambiental, para obtenção de fitoquímicos de elevado valor biológico para a saúde humana.

5. CONCLUSÃO

Os extratos e antocianinas purificadas a partir dos resíduos de uvas cv. Isabel e Magna provenientes da produção de suco de uva integral apresentaram consideráveis teores de antocianinas com variabilidade quanto a sua estrutura química, atividade antioxidante relevante a partir de metodologias variadas (DPPH[•], ABTS^{•+}, CAT e PR), além de atividade antimicrobiana expressiva frente a diferentes cepas microbianas (*S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* e *E. coli*).

Adicionalmente, nenhum dos extratos e antocianinas purificadas analisados exibiram alta atividade citotóxica frente as linhagens não-cancerígenas testadas (L929 e Vero) enquanto que frente a linhagem cancerígena HeLa todas as antocianinas purificadas exibiram atividade (de moderada a alta), assim como o extrato de resíduo de uva Isabel seco, que apresentou potencial citotóxico moderado frente a estas células.

Diante do exposto, o reaproveitamento destes subprodutos apresenta potencial biotecnológico, que pode vir a contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos isolados advindos de resíduo agroindustrial de uva, sendo ainda necessário verificar a possível segurança na utilização destes produtos, seja como antibiótico e/ou no tratamento do câncer, a fim de garantir sua eficácia farmacológica e efeitos adversos reduzidos, e também colaborar para promover a utilização de ingredientes obtidos a partir desta matéria prima residual na indústria cosmética ou de alimentos, implicando na promoção do crescimento econômico e na redução do descarte destes subprodutos no meio ambiente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AAL, E. M.; HUCL, P.; RABALSKI, IWONA. Compositional and antioxidant properties of anthocyanin-rich products prepared from purple wheat. **Food chemistry**, Food Chemistry, v.254, p. 13–19, 2018.

ACOSTA-ESTRADA, B. A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S.O. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, v.152, p.46–55, 2014.

AICHINGER, G.; PAHLKE, G.; NAGEL, L.J.; BERGER, W.; MARKO, D.. Bilberry extract, its major polyphenolic compounds, and the soy isoflavone genistein antagonize the cytostatic drug erlotinib in human epithelial cells. **Food and Function**, n.7, p.3628–3636, 2016.

AGUIAR, J. S. *et al.* Antimicrobial, antiproliferative and proapoptotic activities of extract, fractions and isolated compounds from the stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 4124-4140, 2012.

AGUILAR, T.; BRUIJN, J.; LOYOLA, C.; BUSTAMANTE, L.; VERGARA, C.; BAER, D.; MARDONES, C.; SERRA, I. Characterization of an Antioxidant-Enriched Beverage from Grape Musts and Extracts of Winery and Grapevine By-Products. **Beverages**, v. 4, n.4, p.1-13, 2018.

ALBUQUERQUE, B. R.; PEREIRA, C.; CALHELHA, R. C.; ALVES, M. J.; ABREU, R. M.V.; BARROS, L.; OLIVEIRA, M. B. P.P.; FERREIRA, I. C.F.R. Jaboticaba residues (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) are rich sources of valuable compounds with bioactive properties. **Food Chemistry**, v. 309, 2020.

ALLEY, M. C. *et al.* Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, v. 48, p. 589-601, 1988.

ALMEIDA, J. R. G. S.; ARAÚJO, C. S.; PESSOA, C.Ó; COSTA, M. P.; PACHECO, A. G. M. Atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p.258-264, 2014.

ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTIN, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p.1224-1229, 2008.

ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; RIBEIRO, P. R.V.; BRITO, E. S.; ZOCCOLO, G. J.; SOUZA-LEÃO, P. C.; MARQUES, A. T.B.; QUINTELA, A. L.; LARSEN, F. H.; CANUTO, K. M. ¹H NMR and LC-MS-based metabolomic approach for evaluation of the seasonality and viticultural practices in wines from São Francisco River Valley, a Brazilian semi-arid region. **Food Chemistry**, v.289, p. 558-567, 2019.

ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F. J.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; ENCINAR, J. A.; RODRÍGUEZ-DÍAZ, J. C.; MICOL, V. Antimicrobial Capacity of Plant Polyphenols against Gram-positive Bacteria: A Comprehensive Review. **Current Medicinal Chemistry**, v.27, p.2576-2606, 2020.

AMICO, V.; CHILLEMI, R.; MANGIAFICO, S.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C. Polyphenol-enriched fractions from Sicilian grape pomace: HPLC-DAD analysis and antioxidante activity. **Bioresource technology**, v.99, p.5960-5966, 2008.

ANANTHARAJU, P. G.; GOWDA, P. C.; VIMALAMBIKE, M. G.; MADHUNAPANTULA, S. V. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. **Nutrition Journal**, v.15, n.99, p.1-16, 2016.

ANWAR, S.; FRATANTONIO, D.; FERRARI, D.; SAIJA, A.; CIMINO, F.; SPECIALE, A.. Berry anthocyanins reduce proliferation of human colorectal carcinoma cells by inducing caspase-3 activation and p21 upregulation, **Molecular Medicine Reports**, v.14, p. 1397–1403, 2016.

ARAUJO, W.F.; ROCHA, L.M.; ARAUJO, I.M.S.; PAULA, G.A.; SOUSA, L.S.; FOLHA, M.F. ROCA FILO, L.B.; ARAUJO, R.V. **Brazilian Journal of Development**, v. 4, n. 7, p. 4546-4569, 2018.

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, n.1), p. 191–203, 2006.

BALEA, Ș. S.; PÂRVU, A. E.; POP, N.; MARÍN, F. Z.; PÂRVU, M. Polyphenolic compounds, antioxidant, and cardioprotective effects of pomace extracts from *Fetească neagră* cultivar. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2018.

BENDER, A.; SOUZA, A. L. K.; CALIARI, V.; MALGARIM, M. B.; COSTA, V. B.; GOULART, C. Physicalchemical and sensorial characterization of 'Isabel' grape juices in cuts with different varieties produced in the Rio do Peixe-SC region-Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.23, 2020.

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.

BHARTI, V.; VASUDEVA, N.; SHARMA, S.; DUHAN, J. S. Antibacterial activities of *Origanum vulgare* alone and in combination with different antimicrobials against clinical isolates of *Salmonella typhi*. **Ancient Science of Life**, v.32, n.4, p. 212–216, 2013.

BRAND- WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v.28, n.1, p.25-30, 1995.

BORDIGA, M.; TRAVAGLIA, F.; LOCATELLI, M. Valorisation of grape pomace: an approach that is increasingly reaching its maturity – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v.54, n.4, p. 933-942, 2019.

BURČOVÁ, Z.; FRANTIŠEK, K.; SCHMIDT, Š.; STRIŽINCOVÁ, P.; JABLONSKÝ, M.; KYSELKA, J.; HÁZ, A.; ŠURINA, I. **Antioxidant activity and the tocoferol and phenol contents of grape residues**. *Bioresources*, v. 14, n. 2, p. 4146-4156, 2019.

CAPANOGLU, ESRA; DE VOS, R.C.H.; HALL, R. D.; BOYACIOGLU, D.; BEEKWILDER, J. Changes in polyphenol content during production of grape juice concentrate. **Food Chemistry**, v.139, n. 1-4, p. 521–526, 2013.

CASAGRANDE, M.; ZANELA, J.; PEREIRA, D.; LIMA, V.A.; OLDONI, T.LC.; CARPES, S.T. Optimization of the extraction of antioxidant phenolic compounds from grape pomace using response surface methodology. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v.13, p. 1120–1129, 2019.

CHAREPALLI, V.; REDDIVARI, L.; RADHAKRISHNAN, S.; VADDE, R.; AGARWAL, R.; VANAMALA, J.K.P.. Anthocyanin-containing purple-fleshed potatoes suppress colon tumorigenesis via elimination of colon cancer stem cells. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, v.26, p.1641–1649, 2015.

CHEN, P.N.; CHU, S.C.; CHIOU, H.L.; CHIANG, C.L.; YANG, S.F.; HSIEH, Y.S.. Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis in vitro and suppress tumor growth in vivo. **Nutrition and Cancer**, v. 53 , p.232–243, 2005.

CHEN, P.N.; KUO, W.H.; CHIANG, C.L.; CHIOU, H.L.; HSIEH, Y.S.; CHU, S.C.. Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA expression. **Chemico-biological interactions**, v. 163, n.3, p.218-229, 2006.

CHIKWANHA, O. C.; RAFFRENATO, E.; OPARA, U. L.; FAWOLE, O. A.; SETATI, M. E.; MUCHENJE, V.; MAPIYE, C. Impact of dehydration on retention of bioactive profile and biological activities of different grape (*Vitis vinifera* L.) pomace varieties. **Animal Feed Science and Technology**, v.244, p.116–127, 2018.

CHO, E.; CHUNG, E.Y.; JANG, H.-Y.; HONG, O.-Y.; CHAE, H.S.; JEONG, Y.-J.; KIM, S.-Y.; KIM, B.-S.; YOO, D.J.; KIM, J.-S.; PARK, K.-H. Anti-cancer Effect of Cyanidin-3-glucoside from Mulberry via Caspase-3 Cleavage and DNA Fragmentation in vitro and in vivo. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 17, n.11, p. 1519-1525, 2017.

CIRQUEIRA, M.G.; COSTA, S.S.; VIANA, J.D.; SILVA, C.A.B.C.; UMSZA-GUEZ, M.A.; MACHADO, B.A.S. Phytochemical importance and utilization potential of grape residue from wine production. **African Journal of Bitechology**, v. 16, n5, pp. 179-192, 2017.

COKLAR, H. Antioxidant capacity and phenolic profile of berry, seed and skin of ekşikara (*Vitis vinifera* L) grape: influence of harvest year and altitude. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n.9, 2017.

COSTA, F. S. Análise mensal: Uva industrial – fevereiro a março de 2019. **Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB**, 2019.

DA ROCHA, C.B.; NOREÑA, C. P. Z. Microwave-assisted extraction and Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from grape pomace. **International Journal of Food Engineering**, v. 16, n. 1-2, p. 20190191, 2020.

DAI, J.; PATEL, J.D.; MUMPER, R.J.. Characterization of blackberry extract and its antiproliferative and anti-inflammatory properties. **Journal of medicinal food**, v. 10, n.2, p. 258-65, 2007.

DENEV, P.; ČÍŽ, M.; KRATCHANOVA, M.; BLAZHEVA, D. Blackchokeberry (*Aroniamelanocarpa*) polyphenols reveal different antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities. **Food Chemistry**, v. 284, p.108–117, 2019.

ENOMOTO, H.; SATO, K.; MIYAMOTO, K.; OHTSUKA, A.; YAMANE, H. Distribution Analysis of Anthocyanins, Sugars, and Organic Acids in Strawberry Fruits Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.66, n.19, p.4958-4965, 2018 .

ESPÍN, J.C. *et al.* Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.1588-1592, 2000.

FLAMINI, R. Recent Applications of Mass Spectrometry in the Study of Grape and Wine Polyphenols. **ISRN Spectroscopy**, v. 2013, p. 1- 45, 2013.

FREIRE, J.M.; ABREU, C.M.P.; CORRÊA, A.D.; SIMÃO, A.A.; SANTOS, C.M. Avaliação de compostos funcionais e atividade antioxidante em farinhas de polpa de goiabas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.34, n.3, p.847-852, 2012.

FREITAS, L. C.; BARBOSA, J. R.; COSTA, A.L.C.; BEZERRA, F.W.F.; PINTO, R.H.H.; CARVALHO JUNIO, R. N. From waste to sustainable industry: How can agro-industrial wastes help in the development of new products?. **Resources, Conservation & Recycling**, v.169, 2021.

GAAFAR A. A.; ASKER, M. S.; ALI M.A.; SALAMA, Z. A. The effectiveness of the functional components of grape (*vitis vinifera*) pomace as antioxidant, antimicrobial, and antiviral agents. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v.12, n.5, p. 625-635, 2019.

GARCÍA-VARELA, R.; FAJARDO RAMÍREZ, O.R.; SERNA-SALDIVAR, S.O.; ALTAMIRANO, J.; CARDINEAU, G.A. Cancer cell specific cytotoxic effect of *Rhoeo discolor* extracts and solvent fractions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 190, p.46–58, 2016.

GARZON, G. A.; SOTO, C. Y.; LOPEZ-R, M.; RIEDL, K. M.; BROWMILLER, C. R.; HOWARD, L. Phenolic profile, in vitro antimicrobial activity and antioxidant capacity of *Vaccinium meridionale swartz* pomace. **Heliyon**, v.6, p.2020.

GOMEZ-GARCÍA, R.; CAMPOS, D. A.; AGUILAR, C. N.; MADUREIRA, A. R.; PINTADO, M. Valorisation of food agro-industrial by-products: From the past to the present and perspectives. **Journal of Environmental Management**, v.299, p.1-10, 2021.

GUIMARÃES, R.; BARROS, L.; CALHELHA, R.C.; CARVALHO, A.M.; QUEIROZ, M.J.R.P.; FERREIRA, I.C.F.R. Bioactivity of Different Enriched Phenolic Extracts of Wild Fruits from Northeastern Portugal: A Comparative Study. **Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)**, v. 69, n.1, p. 37-42, 2014.

GÜL, H.; ACUN, S.; ŞEN, H.; NAYIR, N.; TÜRK, S. Antioxidant activity, total phenolics and some chemical properties of Öküzgözü and Narince grape pomace

and grape seed flours. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v.11, n. 2, p. 28 -34, 2013.

HAAS, I. C. S.; MARMITT, D. J.; FEDRIGO, I. M. T.; GOETTERT, M. .; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Evaluation of antiproliferative and anti-inflammatory effects of non-pomace sediment of red grape juices (*Vitis labrusca* L.) in healthy and cancer cells after in vitro gastrointestinal simulation. **PharmaNutrition**, v.13, 2020.

HAN, K.; KITANO-OKADA, T.; SEO, J.; KIM, S.; SASAKI, K.; SHIMADA, K.; FUKUSHIMA, M. Characterisation of anthocyanins and proanthocyanidins of adzuki bean extracts and their antioxidant activity. **Journal of functional foods**, v. 14, p. 692–701, 2015.

HELKAR, P.B.; SAHOO, A.K.; PATIL, N.J. Review: Food Industry By-Products used as a Functional Food Ingredients. **International Journal of Waste Resources**, v.6, n.3, p. 1-6, 2016.

HUANG, H.P.; CHANG, Y.C.; WU, C.H.; HUNG, C.N.; WANG, C.J. Anthocyanin-rich Mulberry extract inhibit the gastric cancer cell growth in vitro and xenograft mice by inducing signals of p38/p53 and c-jun. **Food Chemistry**, v. 129, n.4, p.1703–1709, 2011.

IPEA. ODS – Metas nacionais dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada –IPEA**, 2018.

JOHNSON, J.L.; BOMSER, J.A.; SCHEERENS, J.C.; GIUSTI, M.M.. Effect of black raspberry (*Rubus occidentalis* L.) extract variation conditioned by cultivar, production site, and fruit maturity stage on colon cancer cell proliferation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p.1638–1645, 2011.

KALLI, E.; LAPPA, I.; BOUCHAGIER, P.; TARANTILIS, P.A.; SKOTTI, E. Novel application and industrial exploitation of winery by-products. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n.46, 2018.

KARNOPP, A. R.; MARGRAF, T.; MACIEL, L. G.; SANTOS, J. S.; GRANATO, D. Chemical composition, nutritional and in vitro functional properties of by-

products from the Brazilian organic grape juice industry. **International Food Research Journal**, v.24, n.1, p. 207-214, 2017.

KATO, C. G.; TONHI, C. D.; CLEMENTE, E. Antocianinas de uvas (*Vitis vinifera* L.) produzidas em sistema convencional. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.6, n.2, p.809-821, 2012.

KHOO, H.E.; AZLAN, A.; TANG, S. T.; LIM, S. M. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. **Food & Nutrition Research**, v.61, n.1, 2017.

KLAVINS, L.; KVIESIS, J.; NAKURTE, I.; KLAVINS, M. Berry press residues as a valuable source of polyphenolics: Extraction optimisation and analysis. **LWT - Food Science and Technology**, v.93, p. 583–591, 2018.

KOYAMA, R.; YAMAMOTO, L.Y.; BORGES, W.F.S.; PASCHOLATI, M.B.; BORGES, R.S.; ASSIS, A.M.; ROBERTO, S.R. Épocas de aplicação e concentrações de ácido abscísico no incremento da cor da uva 'Isabel'. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p. 1697-1706, 2014.

KÖCHLING, J.; SCHMIDT, M.; ROTT, Y.; SAGNER, M.; UNGEFROREN, H.; WITTIG, B.; HENZE, G. Can anthocyanins improve maintenance therapy of Ph-acute lymphoblastic leukaemia?. **European journal of haematology**, v. 90, n.4, p. 291-300, 2013.

KUNTZ, S.; KUNZ, C.; RUDLOFF, S. Inhibition of pancreatic cancer cell migration by plasma anthocyanins isolated from healthy volunteers receiving an anthocyanin-rich berry juice. **European journal of nutrition**, v. 56, n.1, p. 203-214, 2017.

LIM, S.; XU, J.; KIM, J.; CHEN, T.Y.; SU, X.; Standard, J.; Carey, E.; Griffin, J.; Herndon, B.; Katz, B.; Tomich, J.; Wang, W. Role of anthocyanin-enriched purple-fleshed sweet potato p40 in colorectal cancer prevention. **Molecular nutrition & food research**, v. 57, n.11, p.1908-1917, 2013.

LIMA, M.C.; SOUSA, C. P.; FERNANDEZ-PRADA, C.; HAREL, J.; DUBREUIL, J.D.; SOUZA, E.L. A review of the current evidence of fruit phenolic compounds

as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v.130, p. 259–270, 2019.

LIU, W.; XU, J.; LIU, Y.; YU, X.; TANG, X.; WANG, Z.; LI, X.. Anthocyanins potentiate the activity of trastuzumab in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer cells in vitro and in vivo. **Molecular Medicine Reports**, v. 10, p.1921–1926, 2014.

LUCHIAN, C.E.; COTEA, V.V.; VLASE, L.; TOIU, A.M.; COLIBABA, L.C.; RĂSCHIP, I.E.; NADĂȘ, G.; GHELDIU, A.M.; TUCHILUȘ, C.; ROTARU, L. Antioxidant and antimicrobial effects of grape pomace extracts. **BIO Web of Conferences**, v. 15, n. 04006, 2019.

MA, Y.; DING, S.; FEI, Y.; LIU, G.; JANG, H.; FANG, JUN. Antimicrobial activity of anthocyanins and catechins against foodborne pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella*. **Food Control**, v.106, p. pp.106712, 2019.

MACHADO, N. F. L.; DOMÍNGUEZ-PERLES, R. Addressing Facts and Gaps in the Phenolics Chemistry of Winery By-Products. **Molecules**, v. 22, p. 286, 2017.

MAIEVES, H.A.; LÓPEZ-FROILÁN, R.; MORALES, P.; PÉREZ –RODRÍGUEZ, M.L.; RIBANI, R.H.; CÁMARA, M.; SÁNCHEZ-MATA, M.C. Antioxidant phytochemicals of *Hovenia dulcis* Thunb. peduncles in different maturity stages. **Journal of Functional Foods** , v.18, part.B, p.1117-1124, 2015.

C. MAZEWSKI, K. LIANG, E. GONZALEZ DE MEJIA. Comparison of the effect of chemical composition of anthocyanin-rich plant extracts on colon cancer cell proliferation and their potential mechanism of action using in vitro, in silico, and biochemical assays. **Food Chemistry**, v.242, p. 378–388, 2018.

MATTOS, G. N; TONON, R. V.; FURTADO, A. A. L; CABRAL, L. M.C. Grape by-product extracts against microbial proliferation and lipid oxidation: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.97, p.1055–1064, 2017.

MELO-SILVEIRA, R. F.; FIDELIS, G. P.; VIANA, R. L. S.; SOEIRO, V. C.; SILVA, R. A.; MACHADO, D.; COSTA, L. S.; FERREIRA, C. V.; ROCHA, H. A. O.

Antioxidant and Antiproliferative Activities of Methanolic Extract from a Neglected Agricultural Product: Corn Cobs. **Molecules**, v.19, n.4, p. 5360-5378, 2014

MELLO, L. M. R.; MACHADO, C. A. E. Vitivinicultura brasileira: panorama 2019. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2020. (**Embrapa Uva e Vinho. Comunicado técnico, 214**).

MILUTINOVIĆ, M.; VASIĆ, S.; OBRADOVIĆ, A.; ZUHER, A.; JOVANOVIĆ, M.; RADOVANOVIĆ, M.; ČOMIĆ, L.; MARKOVIĆ, S. Phytochemical Evaluation, Antimicrobial and Anticancer Properties of New “Oligo Grapes” Supplement. **Natural Product Communications**, v.1, n.6, p.1-9, 2019.

MONTEIRO, G.C.; MINATEL, I.O.; JUNIOR, A.P.; GOMEZ-GOMEZ, H.A.; CAMARGO, J.P.C.; DIAMANTE, M.S.; BASILIO, L.S.P.; TECCIO, M.A.; LIMA, G.P.P. Bioactive compounds and antioxidant capacity of grape pomace flours. **LWT- Food Science and Technology**, v.135, 2021.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

NECHITA A.; COTEA, V. V.; NECHITA, C.B.; PINCU, R.R.; MIHAI, C.T.; COLIBABA, C.L.. Study of cytostatic and cytotoxic activity of several polyphenolic extracts obtained from *Vitis vinifera*. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 40, n.1, p. 216-221, 2012.

OMBRA, M.N.; D'ACIERNO, A.; NAZZARO, F.; RICCARDI, R.; SPIGNO, P.; ZACCARDELLI, M.; PANE, C.; MAIONE, M.; FRATIANNI, F. Phenolic Composition and Antioxidant and Antiproliferative Activities of the Extracts of Twelve Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Endemic Ecotypes of Southern Italy before and after Cooking. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2016.

ONGKOWIJOYO, P.; LUNA-VITAL, D. A.; MEJIA, E. G. Extraction techniques and analysis of anthocyanins from food sources by mass spectrometry: An update. **Food Chemistry**, v. 250, p. 113–126, 2018.

ONU. Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development. General Assembly 70 Session, 16301, 1–35. **Organização das Nações Unidas – ONU**, 2015.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A. CAMACHO, M.; GUERRA, H. SWINGS., J. PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, v.46, n.8, p. 2720-2722, 2002.

PARK, S.Y.; LEE, Y.K.; LEE, W.S.; PARK, O.J.; KIM, Y.M.. The involvement of AMPK/GSK3- β signals in the control of metastasis and proliferation in hepatocarcinoma cells treated with anthocyanins extracted from Korea wild berry Meoru. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.14, n.109, 2014.

PEIXOTO, C. M.; DIAS, M. I.; ALVES, M. J.; CALHELHA, R. C.; BARROS, L.; PINHO, S. P.; FERREIRA, I. C.F.R. Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. **Food Chemistry**, v.253, p. 132–138, 2018.

PEREIRA, D. T. V.; TARONE, A. G.; CAZARIN, C. B. B.; BARBERO, G. F.; MARTÍNEZ, J. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from grape marc. **Journal of Food Engineering**, 2018.

PORTO, C.; PORRETTO, E.; DECORTI, D. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.20, n.4, p.1076–1080, 2013.

PUBCHEM. **Sucrose**. Disponível em:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sucrose#section=Structures>.
Acesso em 17 nov. 2021.

PUBCHEM. **Tartaric acid**. Disponível em:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tartaric-acid#section=2D-Structure>. Acesso em 17 nov. 2021.

PUBCHEM. **Gallic acid.** Disponível em:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallic-acid#section=2D-Structure>.
Acesso em 17 nov. 2021.

PUBCHEM. **Catechin.** Disponível em:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Catechin#section=2D-Structure>.
Acesso em 17 nov. 2021.

PUBCHEM. **Epicatechin.** Disponível em:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Epicatechin#section=2D-Structure>.
Acesso em 17 nov. 2021.

PUBCHEM. **Peonidin-3-O-glucoside.** Disponível em:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Peonidin-3-O-glucoside>. Acesso em 17 nov. 2021.

PUBCHEM. **Malvidin-3-O-glucoside.** Disponível em:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/malvidin-3-O-glucoside#section=2D-Structure>. Acesso em 17 nov. 2021.

PUBCHEM. **Quercetin-3-O-glucuronide.** Disponível em:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quercetin-3-O-glucuronide#section=Structures>. Acesso em 17 nov. 2021.

SIGMA ALDRICH. **Pelargonidin-3-glucoside.** Disponível em:
<https://www.google.com/search?q=structure+pelargonidin-3-glycoside&oq=structure+pelargonidin-3-glycoside&aqs=chrome..69i57j35i39i362l6j69i60.378j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8>. Acesso em 18 nov. 2021.

SIGMA ALDRICH. **Cyanidin-3,5-diglucoside.** Disponível em:
https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/substance/cyanidin35diglucosidechloride646982611678?gclid=CjwKCAiA866PBhAYEiwANKlneBHcJwjHcObNBBRH1tS_dACTDJnonhsQWfXUXS88UFfARUFMOPI9_hoCiz8QAvD_BwE. Acesso em: 18 nov. 2021.

SIGMA ALDRICH. **Cyanidin-3-glucoside**. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/search/cyanidin-3-glucoside?focus=products&page=1&perPage=30&sort=relevance&term=cyanidin-3-glucoside&type=product_name. Acesso em: 18 nov. 2021.

SIGMA ALDRICH. **Malvidin-3,5-di -O- glucoside**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/search/chloride-malvin?focus=products&page=1&perPage=30&sort=relevance&term=chloride%20malvin&type=product>. Acesso em: 18 nov. 2021.

SIGMA ALDRICH. **Delphinidin-3-glucoside**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/search/chloride-myrtillin?focus=products&page=1&perPage=30&sort=relevance&term=chloride%20myrtillin&type=product>. Acesso em: 18 nov. 2021.

SIGMA ALDRICH. **Malvidin-3-glucoside**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/search/chloride-oenin?focus=products&page=1&perPage=30&sort=relevance&term=chloride%20oenin&type=product>. Acesso em: 15 nov. 2021.

SIGMA ALDRICH. **Peonidin-3-O-glucoside**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/search/chloride-peonidin-3-%CE%BF-glucoside?focus=products&page=1&perPage=30&sort=relevance&term=chloride%20peonidin-3-%CE%9F-glucoside&type=product>. Acesso em: 17 nov. 2021.

SIGMA ALDRICH. **Petunidin-3-O-glucoside**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/search/chloride-petunidin?focus=products&page=1&perPage=30&sort=relevance&term=chloride%20petunidin&type=product>. Acesso em: 15 nov. 2021.

RESTUCCIA, D.; SICARI, V.; PELLICANÒ, T.M.; SPIZZIRRI, U.G.; LOIZZO, M.R. The impact of cultivar on polyphenol and biogenic amine profiles in Calabrian red grapes during winemaking. **Food Research International**, v.102, p.303–312, 2017.

RIZZON, L. A.; MIELE, A.; MENEGUZZO, J. Evaluation of cv. Isabel to elaborate red table wine. **Food Science and Technology**, n.20, v.1, p. 2000

RONDEAU, P.; GAMBIER, F.; JOLIBERT, F.; BROSSE, N. Compositions and chemical variability of grape pomaces from French vineyard. **Industrial Crops and Products**, v.43, p.251–254, 2013.

RITSCHHEL, P.; MAIA, J. D. G.; CAMARGO, U. A.; ZANUS, M. C.; SOUZA, R. T.; FAJARDO, T. V. M. 'BRS MAGNA' – a novel grape cultivar for juice making, with wide climatic adaptation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 14, p. 266-269, 2014.

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**, v.28(Supl.), p. 238-244, 2008.

RODRIGUEZ-SAONA, L.E.; WROLSTAD, R.E. Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry** (pp.FI 1.1-1.11). New York: John Wiley & Sons, 2001.

RUBIO, C. P.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; MARTINEZ-SUBIELA, S.; TVARIJONAVICIUTE, A.; CERON, J. J. Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: an update. **BMC Veterinary Research**, v.12, n.166,2016.

SALEHI, B.; VLAISAVLJEVIC, S.; ADETUNJI, C.O.; ADETUNJI, J.B.; KREGIEL, D.; ANTOLAK, H.; PAWLIKOWSKA, E.; UPRETY, Y.; MILESKI, K. S.; DEVKOTA, H. P.; SHARIFI-RAD, J.; DAS, G.; PATRA, J. K.; JUGRAN, A. K.; SEGURA-CARRETERO, A.; DEL MAR CONTRERAS, M. Plants of the genus *Vitis*: Phenolic compounds, anticancer properties and clinical relevance. **Trends in Food Science & Technology**, v.91, p.362–379, 2019.

SARKISIAN, G. Research of the properties of grape processing products in relation to its application in spa and wellness industries. **Харчова наука і технологія / Food science and technology**, v. 13, n. 1, p. 11-18, 2019.

SATO, A.J.; Silva, B.J.; BERTOLUCCI, R.; CARIELO, M.; GUIRAUD, M.C.; FONSECA, I.C.B; ROBERTO, S.R. Evolução da maturação e características

físico-químicas de uvas da cultivar Isabel sobre diferentes porta-enxertos na Região Norte do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 11-20, 2009.

SHAHIDI, F.; YEO, J. Bioactivities of Phenolics by Focusing on Suppression of Chronic Diseases: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, n.1573. p. 1-16, 2018.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of functional foods**, v.18, p.820–897, 2015.

SHIMAMURA, T.; SUMIKURA, Y.; YAMAZAKI, T.; TADA, A.; KASHIWAGI, T.; ISHIKAWA, H.; MATSUI, T.; SUGIMOTO, N.; AKIYAMA, H.; UKEDA, H. Applicability of the DPPH assay for evaluating the antioxidant capacity of food additives - inter-laboratory evaluation study. **Analytical Sciences**, v.30, n.7, p.717-721, 2014.

SILVA, S.; COSTA, E.M.; MENDES, M.; MORAIS, R.M.; CALHAU, C.; PINTADO, M.M. Antimicrobial, antiadhesive and antibiofilm activity of an ethanolic, anthocyanin-rich blueberry extract purified by solid phase extraction. **Journal of Applied Microbiology**, v.121, p.693-703, 2016.

SILVA, G. S.; CANUTO, K. M.; RIBEIRO, P. R. V.; BRITO, E. S.; NASCIMENTO, M. M.; ZOCOLO, G. J.; COUTINHO, J. P.; JESUS, R. M. Chemical profiling of guarana seeds (*Paullinia cupana*) from different geographical origins using UPLC-QTOF-MS combined with chemometrics. **Food Research International**, v.102, p.700–709, 2017a.

SILVA, F. A.; OLIVEIRA, M. E. G.; FIGUEIRÊDO, R. M. F.; SAMPAIO, K. B.; SOUZA, E. L.; OLIVEIRA, C. E. V.; PINTADO, M. M. E.; QUEIROGA, R. C. R. E. The effect of Isabel grape addition on the physicochemical, microbiological and sensory characteristics of probiotic goat milk yogurt. **Food and Function**, v.8, n.6, p.2121-2132, 2017b.

SILVA, S.; COSTA, E. M.; CALHAU, C.; MORAIS, R. M.; PINTADO, M. E. Anthocyanin extraction from plant tissues: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.57, n.14, p.3072-3083, 2017c.

SILVA, G.V.; MACHADO, B.A.S.; OLIVEIRA, W.P.; SILVA, C.F.G.; QUADROS, C.P.; DRUZIAN, J.I. FERREIRA, E.S.; UMSZA-GUEZ, M.A. Effect of Drying Methods on Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity in Grape Skin Residues from the New Hybrid Variety “BRS Magna”. **Molecules**, v.25, n.3701, 2020.

SIROHI, R.; TARAFDAR, A.; SINGH, S.; NEGI, T.; GAUR, K. V.; GNANSOUNOU, E.; BHARATHIRAJA, B. Green processing and biotechnological potential of grape pomace: Current trends and opportunities for sustainable biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 314, 2020.

SLEE, E.A.; ADRAIN, C.; MARTIN, S.J. Executioner Caspase-3, -6, and -7 Perform Distinct, Non-redundant Roles during the Demolition Phase of Apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.7320–7326, 2001.

SMERIGLIO, A.; BARRECA, D.; BELLOCCO, E.; TROMBETTA, D. Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins. **Phytotherapy Research**, v.30, p.1265–1286, 2016.

SORRENTI, V.; VANELLA, L.; ACQUAVIVA, R.; CARDILE, V.; GIOFRÈ, S.; DI GIACOMO, C. Cyanidin induces apoptosis and differentiation in prostate cancer cells. **International Journal of Oncology**, v.47, p.1303–1310, 2015.

SUN, H.; ZHANG, P.; ZHU, Y.; LOU, Q.; HE, S. Antioxidant and prebiotic activity of five peonidin-based anthocyanins extracted from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). **Scientific Reports**, v.8, n.1, 2018a.

SUN, X.; ZHOU, T.; WEI, C.; LAN, W.; ZHAO, Y.; PAN, Y.; WU, V. C.H. Antibacterial effect and mechanism of anthocyanin rich Chinese wild blueberry extract on various foodborne pathogens. **Food Control**, v.94, p.155-161, 2018b.

TANG, J.; YAN, Y.; RAN, L.; MI, J.; SUN, Y.; LU, L.; GAO, Y.; ZENG, X.; CAO, Y. Isolation, antioxidant property and protective effect on PC12 cell of the main anthocyanin in fruit of *Lycium ruthenicum* Murray. **Journal of functional foods**, v. 30, p. 97-107, 2017.

TENA, N.; MARTÍN, J.; ASUERO, A. G. State of the art of anthocyanins: antioxidant activity, sources, bioavailability, and therapeutic effect in human health. **Antioxidants**, v.9, n.451, p. 1-28, 2020.

TOALDO, I.M.; FOGOLARI, O.; PIMENTEL, G.C.; GOIS, J.S.; BORGES, D. L.G.; CALIARI, V.; LUIZ, M.B. Effect of grape seeds on the polyphenol bioactive content and elemental composition by ICP-MS of grape juices from *Vitis labrusca* L. **LWT - Food Science and Technology**, v.53, n.1, p.1-8, 2013.

TOMMONARO, G.; PRISCO, R.; ABBAMONDI, G.R.; NICOLAUS, B. Bioactivity of tomato hybrid powder: Antioxidant compounds and their biological activities, **Journal of Medicinal Foods**, v.16, p. 351–356, 2013.

TROŠT, K.; KLANČNIK, A.; MOZETIČ, V. B.; STERNAD, L. M.; JUG, N. K.; RASPOR, P.; SMOLE, M. S. Polyphenol, antioxidant and antimicrobial potential of six different white and red wine grape processing leftovers. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.96, n.14, p.4809–4820, 2016.

TUNGMUNNITHUM, D.; THONGBOONYOU, A.; PHOLBOON, A.; YANGSABAI, A. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. **Medicines**, v.5, n.93, 2018.

VALLS, J.; AGNOLET, S.; HAAS, F.; STRUFFI, I.; CIESA, F.; ROBATSCHER, P.; OBERHUBER, M. Valorization of Lagrein grape pomace as a source of phenolic compounds: analysis of the contents of anthocyanins, flavanols and antioxidant activity. **European Food Research and Technology**, v.243, p. 2211–2224, 2017.

VIZZOTTO, M.; PORTER, W.; BYRNE, D.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.. Polyphenols of selected peach and plum genotypes reduce cell viability and inhibit proliferation of breast cancer cells while not affecting normal cells. **Food Chemistry**, v.164, p. 363–370, 2014.

XU, Y.; BURTON, S.; KIM, C.; SISMOUR, E. Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four Virginia-grown grape varieties. **Food Science and Nutrition**, v.4, n.1, p.125–133, 2016.

YANG, L.; RONG-RONG, C.; JI-LI, F.; KE, Y. total anthocyanins and cyanidin-3-o-glucoside contents and antioxidant activities of purified extracts from eight different pigmented plants. **Pharmacognosy Magazine**, v.15, n. 60, p. 124-129, 2019.

ZIKRI, N.N.; RIEDL, K.M.; WANG, L.S.; LECHNER, J.; SCHWARTZ, S.J.; STONER, G.D.. Black raspberry components inhibit proliferation, induce apoptosis, and modulate gene expression in rat esophageal epithelial cells. **Nutrition and Cancer**, v.61, n.6, p. 816–826, 2009.

ZHANG, M.; MA, J.; BI, H.; SONG, J.; YANG, H.; XIA, Z.; DU, Y.; GAO, T.; WEI, LIXIN. Characterization and cardioprotective activity of anthocyanins from *Nitraria tangutorum* Bobr. by-products. **Food & Function**, v.8, n.8, p. 2771-2782, 2017.

ZHANG, L.; FAN, G.; KHAN, M. A.; YAN, Z.; BETA, T. Ultrasonic-assisted enzymatic extraction and identification of anthocyanin components from mulberry wine residues. **Food Chemistry**, v.323, p. 1-8, 2020.

ZHAO, X., ZHANG, S-S., ZHANG, X-K., HE, F., DUAN, C-Q. An effective method for the semi-preparative isolation of high-purity anthocyanin monomers from grape pomace. **Food Chemistry**, v.1, p. 1-30, 2019.

ZHOU, L.; WANG, H.; YI, J.; YANG, B.; LI, M.; HE, D.; YANG, W.; ZHANG, Y.; NI, H. Anti-tumor properties of anthocyanins from *Lonicera caerulea* 'Beilei' fruit on human hepatocellular carcinoma: In vitro and in vivo study. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.104, p.520–529, 2018.

ZHOU, L.; XIE, M.; YANG, F.; LIU, J. Antioxidant activity of high purity blueberry anthocyanins and the effects on human intestinal microbiota. **LWT - Food Science and Technology**, v. 117, 2020.

