



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(21) BR 102021025963-9 A2

(22) Data do Depósito: 21/12/2021

(43) Data da Publicação Nacional:
27/06/2023

(54) **Título:** PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ANTOCIANINAS PURIFICADAS A PARTIR DE RESÍDUO DE UVA COM CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

(51) **Int. Cl.:** A61K 31/05.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO (UFRPE).

(72) **Inventor(es):** ERIKA DE ARRUDA NASCIMENTO; BRUNO OLIVEIRA DE VERAS; VERA LÚCIA ARROXELAS GALVÃO DE LIMA; JACIANA DOS SANTOS AGUIAR.

(57) **Resumo:** PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ANTOCIANINAS PURIFICADAS A PARTIR DE RESÍDUO DE UVA COM CAPACIDADE ANTIOXIDANTE. A presente invenção refere-se ao processo de obtenção de antocianinas purificadas, a partir de resíduo agroindustrial de uva, na forma de bagaço ou pó, utilizando a técnica de remolho das amostras com água destilada, em refrigeração, antes de realizar a extração e purificação das antocianinas, e dispensando o uso de equipamentos como o manifold e a bomba a vácuo comumente utilizados no processo de extração em fase sólida. O conteúdo de antocianinas presente nos resíduos de uva Magna seco e úmido 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, apresentando as amostras propriedades antioxidantes e podendo ser utilizada elaboração de produtos na indústria farmacêutica, de cosméticos, e de alimentos e bebidas.

Figura 4.

Amostras (ACIP)	DPPH* (mg EQ Trolox /g extrato seco)	ABTS** (mg EQ Trolox/g extrato seco)	CAT (mg EQ AA/g extrato seco)	FR (mg EQ AA/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

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ANTOCIANINAS PURIFICADAS A PARTIR DE RESÍDUO DE UVA COM CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Campo da Invenção

001. A presente invenção refere-se ao processo de extração e obtenção de antocianinas purificadas a partir de resíduo de uva (casca e semente), utilizando a matéria prima pré-tratada (remolho), apresentando propriedades antioxidantes, com aplicações na área farmacêutica, alimentícia e cosmética, em forma de aditivo, soluções, suspensões, xaropes, injetáveis, pomadas, cremes, emulsões, nano emulsões, aerossóis, pós, cápsulas, tabletes, comprimidos ou drágeas, isoladamente ou combinados.

Antecedentes da Invenção

002. 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).

003. O bagaço resultante do processamento de uvas é considerado de alto valor nutritivo, pois contém matrizes de fibras dietéticas ricas em fenólicos e compostos com atividades antioxidante e antibacteriana, que juntos, contribuem na prevenção de doenças cardiovasculares e câncer (ZHU et al., 2015).

004. 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, representa uma desvantagem atual da, 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).

005. 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.

006. 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).

007. A uva pode ser definida como o fruto da videira, pertencente a ordem das *Ramnidea*, família das *Vitaceas*, do gênero *Vitis*, e com várias espécies, onde podemos citar a *Vitis vinifera* e a *Vitis labrusca*, como exemplos. Foi introduzida no Brasil em 1535, em várias regiões, e é uma das frutas mais produzidas e consumidas em todo o planeta (GUERRA et al., 2009).

008. As uvas da variedade *Vitis labrusca* L. que são produzidas no Brasil tem sua utilização destinada principalmente para a elaboração de sucos, e suas cultivares representam mais de 80% do total de uvas destinadas a processamento, sendo também empregadas na produção de vinhos de mesa, doces, compotas e vinagres (TOALDO et al., 2013).

009. A uva Isabel (*Vitis labrusca*) tem sido considerada há muito tempo como matéria prima principal para a produção de suco de uva brasileiro, por ser uma planta bastante fértil, que apresenta alta produtividade e boa capacidade de acúmulo de açúcar (KOYAMA et al., 2014; SATO et al., 2009). Em adição a estes fatores, segundo Dalbó et al. (2015), por serem rústicas, tais uvas demonstram resistência a determinadas pragas agrícolas, como a filoxera, além de proporcionarem diferentes formas de consumo, qualidades estas que consolidam cada vez mais o sucesso do plantio de uva Isabel no Brasil, em especial no sul do país.

010. 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 (RITSCHHEL et al., 2014).

011. 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 estes autores, a "BRS Magna" apresenta 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.

012. 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, anti-virais e antimicrobianas, que divergem de acordo com o tipo de uva.

013. As antocianinas, pigmentos presentes em quantidades relevantes nas uvas escuras, , pertencem ao grupo dos flavonoides, uma sub-classe do grupo dos fenólicos, compostos que possuem forte ação antioxidante, são quelantes de metais, além de atuar como sequestradores de radicais livres, e por exibir estas atividades diversas 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).

014. Cabe destacar 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 uma alternativa positiva visto que apresenta 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).

015. Porém, poucos estudos tem se concentrado em desenvolver métodos que pudessem aperfeiçoar os processos de extração e purificação de antocianinas advindas de resíduos de uva, bem como em avaliar a atividade antioxidante que estes compostos obtidos a partir do bagaço da uva pudessem apresentar.

016. Atualmente, existem pedidos de patentes a partir da uva e seus subprodutos, visando desenvolver novas técnicas de extração e purificação de antocianinas e o desenvolvimento de novas terapias a partir destes, com foco em suas propriedades antioxidante.

017. Através de uma busca por patentes a partir de processos para extração e purificação de antocianinas a partir de diferentes matérias primas, é possível identificar no Google Patents diversos depósitos de patentes de invenção no Google Patents, entretanto divergem do processo proposto desta invenção, tais como os registros: US 6.544.581.B1, intitulado “PROCESS FOR EXTRACTION, PURIFICATION AND ENRICHMENT OF POLYPHENOLIC SUBSTANCES FROM WHOLE GRAPES, GRAPE SEEDS AND GRAPE POMACE”, que para a extração utiliza água quente, tratamento do pH dos extratos e o uso de um copolímero de trimetacrilato de

trimetilolpropano como uma resina adsorvente para maximizar a concentração e purificação; US 2012/0164089 A1, intitulado por "ANTHOCYANIN PIGMENT/DYE COMPOSITIONS AND SOLUTIONS THROUGH CORN EXTRACTION", que realiza a extração das antocianinas em fase aquosa e através de agitação em temperatura acima de 35°C; WO 2007/038685 A2, intitulado por "GRAPE EXTRACT, DIETARY SUPPLEMENT THEREOF, AND PROCESSES THEREFOR", que utiliza enzimas para maximizar o processo de extração e tem como foco a obtenção de procianidinas monoméricas e oligoméricas; WO 2010/009667 A1, intitulado por "METHOD FOR PRODUCING AN EXTRACT OF VITIS VINIFERA HAVING HIGH ORAC VALUES AND THE EXTRACT PRODUCED BY SAID METHOD", no qual a extração ocorre por maceração em etanol e com posterior filtração em resinas macroporosas; WO 2012/066144 A1, intitulado por "PROCEDE D'EXTRACTION DE MOLECULES D'INTERET A PARTIR DE TOUT OU PARTIE D'UNE MATRICE VEGETALE", que para a extração realiza o processamento da matriz vegetal por meio de pulso elétrico e a difusão das moléculas de interesse em um solvente hidroalcolóico e/ou em um solvente incluindo acetato de etila; e WO 2013/021076 A1, intitulada por "GRAPE EXTRACT, NUTRITIONAL SUPPLEMENT COMPRISING GRAPE EXTRACT, AND THE USE THEREOF AS A FUNCTIONAL INGREDIENT", que utiliza resíduos de uva advindos da vinificação, os quais são submetidos a um processo de extração sólido-líquido por difusão em contracorrente contínua, e o líquido resultante é submetido a secagem por liofilização ou atomização (*spray - dryer*) para obtenção do extrato.

018. No banco nacional de patentes do INPI foi possível obter apenas os seguintes depósitos: PI 0308698-4 A8 intitulado "PROCESSO PARA A EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS DE ARROZ PRETO E COMPOSIÇÃO DESTES"; PI 0107227-7 A2, intitulado "PROCESSO DE EXTRAÇÃO ALCOÓLICA ACIDIFICADA DE ANTOCIANINAS DOS FRUTOS DAS PALMEIRAS DO GÊNERO EUTERPE"; e BR 10 2018 076045 9, intitulado "PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CORANTE EM PÓ A PARTIR DE ANTOCIANINAS EXTRAÍDAS DE REPOLHO ROXO".

No entanto, não foi possível obter nenhum pedido ou depósito que apresente o método de extração e purificação, e nem a matéria prima utilizada na referida invenção proposta.

019. Em relação a extração e purificação de antocianinas presentes em resíduos de uvas, foi possível encontrar os seguintes depósitos de patentes: CN110643196A, intitulado por “EXTRACTION AND SEPARATION METHOD OF ANTHOCYANIN”; e CN111825730A, intitulado por “METHOD FOR EXTRACTING AND SEPARATING 14 ANTHOCYANIN MONOMERS FROM GRAPE SKIN RESIDUES OR FRESH FRUIT PEELS”. Contudo, nenhum depósito foi encontrado que utilizasse o remolho das amostras em refrigeração por 24 horas, antes de submetê-las a extração, de forma a facilitar a separação das fases polar e apolar, e posterior purificação das antocianinas.

020. Ainda sobre a extração e purificação de antocianinas presentes em resíduos de uvas, foi possível encontrar os seguintes depósitos de patentes: PI 2015703087, intitulado por “METHOD OF PREPARING A MUSCADINE POMACE EXTRACT”, mas este método não utiliza o remolho prévio da amostra, não realiza a purificação das antocianinas e utiliza matérias primas diferentes, não advindas do processamento industrial; EP1328282B1, intitulado por “EFFICIENT METHOD FOR PRODUCING COMPOSITIONS ENRICHED IN ANTHOCYANINS”, que, no entanto, não utiliza resíduos agroindustriais de uva e o método de extração e purificação de antocianinas não é precedido do remolho por 24 horas, sob refrigeração; ES2593258B1, intitulado por “EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS A PARTIR DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA DE LA VINIFICACIÓN” que apesar de utilizar resíduos de uva, não os obtém da produção de suco, e não realizaram processos de purificação de antocianinas; e WO2020/219686A1, intitulado por “ANTHOCYANIN EXTRACTION METHODS”, que apesar de extrair antocianinas de resíduos de uva, o método de extração não é precedido do remolho por 24 horas, sob refrigeração, não há a purificação de antocianinas, e nem detecção da atividade antioxidante, como na presente invenção.

021. O teor e o tipo de compostos responsáveis pela atividade antioxidante em frutos, como os compostos fenólicos, podem variar em função da cultivar, estágio de maturação do fruto, tipo e condições de cultivo (FREIRE et al., 2012). Pesquisas têm investigado a capacidade antioxidante de uvas e seus subprodutos, matérias primas estas ricas em antocianinas, e em análise da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH de farinha de resíduo de uva cv. Öküzgözü e de uva tinta, Gül et al. (2013) e Zhao et al. (2015) encontraram valores significativos. Lopes et al. (2014), Balestro et al. (2011) e Maieves et al. (2015) investigaram a capacidade de sequestrar o radical ABTS para a farinha do resíduo de uva cv. Concord, cv. Bordô e pseudofruto de *Hovenia dulcis* Thunberg (uva japonesa) liofilizado, encontrando também valores expressivos.

022. Estudos também têm se dedicado a análise do potencial antioxidante de antocianinas obtidas através do processo de purificação de diferentes extratos. Yang et al. (2019) ao investigarem 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 (a 50%, pH 2), 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.

023. Zhou et al. (2020) investigaram a atividade antioxidante de antocianinas purificadas provenientes de extratos etanólicos acidificados (a 80%, 0,1% de ácido fórmico) de mirtilo (frutos frescos inteiros), e encontraram valores de EC₅₀ de 26,44 e 14,99 µg EQ AA/ mL, para as capacidades de sequestro dos radicais DPPH e ABTS, respectivamente, que apesar de utilizar forma de expressão distinta do presente estudo, reforça a capacidade antioxidante de antocianinas submetidas a purificação.

024. Outros pesquisadores tem investigado o potencial antioxidante de antocianinas purificadas obtidas a partir de resíduos desidratados, e relatam resultados promissores. Ao investigar a atividade antioxidante da fração de antocianinas purificadas do resíduo proveniente da produção de suco do fruto *Nitraria tangutorum* Bobr. (cascas e sementes), Zhang et al. (2017) encontraram valores de EC₅₀ de 5.23µg/

mL frente a capacidade de eliminação do radical DPPH, além de bom Poder Redutor em concentrações de 120 µg/ mL, o que de acordo com os autores indica uma boa atividade antioxidante das antocianinas provenientes deste resíduo.

025. Ao analisarem antocianinas purificadas obtidas a partir de frutos secos inteiros de *Lycium ruthenicum* Murray, submetidos a extração com etanol a 80% acidificado (com HCl, a pH 2,5), Tang et al. (2017), encontraram valores de EC₅₀ de 106,53 e 82,14 µg/ mL para a capacidade de sequestro dos radicais DPPH e ABTS, respectivamente, sendo a capacidade antioxidante maior frente ao segundo radical devido ao hidrofiliismo, de acordo com os autores.

026. Sobre as propriedades antioxidantes de diferentes extratos de resíduos de uva, foi possível encontrar os seguintes depósitos de patentes: US 2013 O184228A1, intitulado por “MUSCADINE COMPOSITIONS WITH ANTI-OXIDANT ACTIVITY”, que embora investigue a atividade antioxidante de bagaço de uva, utiliza método de extração diferente do da presente invenção, bem como não realiza a purificação das antocianinas e, conseqüentemente, não verifica sua atividade antioxidante; WO2004/089891A1, intitulado por “PROCESS FOR ISOLATING ANTIOXIDANTS FROM PLANT WASTE MATERIAL, AND THEIR USE AS FOODSTUFF SUPPLEMENT”, que apesar de extrair compostos fenólicos de resíduos de uva e verificar sua atividade antioxidante, o método de extração não é precedido do remolho por 24 horas, sob refrigeração, e não há a purificação de antocianinas, como na presente invenção; e ES2779984A1, intitulado por “PROCEDIMIENTO PARA IDENTIFICAR PROPIEDADES DE UN EXTRACTO DE UVA”, que apesar de investigar a atividade antioxidante de um extrato de resíduo de uva, utiliza método de extração diferente do da presente invenção, bem como não realiza a purificação das antocianinas e, conseqüentemente, não verifica sua atividade antioxidante.

027. Outros depósitos de patentes também se dedicaram ao estudo das antocianinas e suas propriedades, porém com diferenças quanto a esta invenção, como: USOO6544581B1, intitulado por “PROCESS FOR EXTRACTION, PURIFICATION AND ENRICHMENT OF POLYPHENOLIC SUBSTANCES FROM WHOLE

GRAPES, GRAPE SEEDS AND GRAPE POMACE” , que embora realize a extração e purificação de antocianinas de resíduos de uva, faz uso de métodos de extração disparem ao desta invenção, além de não quantificar a atividade antioxidante dos compostos obtidos; e o US 20200017690A1, intitulado por “METHODS FOR OBTAINING NATURAL COLOURANTS FROM PLANT BASED MATERIALS” , que embora faça a extração e purificação de antocianinas, não utiliza como matéria prima resíduos de uva, não analisa a atividade antioxidante das antocianinas purificadas, além do método de extração e purificação de antocianinas não ser precedido do remolho por 24 horas, sob refrigeração, como na presente invenção.

Vantagens da Invenção

028. A extração e purificação de antocianinas realizada através do resíduo agroindustrial proveniente da produção de suco de uva integral, na forma de bagaço e de farinha, destaca-se por obter antocianinas purificadas que apresentam atividade antioxidante.

029. Além de apresentar-se como uma alternativa natural para o controle do estresse oxidativo (atividade antioxidante), as antocianinas purificadas na presente invenção são provenientes de dois subprodutos que apresentam quase ou nenhum uso por parte dos produtores, mas que apresentam quantidades relevantes de compostos bioativos benéficos a saúde humana em sua composição, diminuindo assim os impactos ambientais caso eles fossem descartados de forma incorreta além de agregar valor econômico a estas matérias primas antes subutilizadas ou desprezadas, com a geração de novos produtos.

030. Neste processo, com a utilização do resíduo, a purificação é viável apenas a partir da aplicação do remolho em refrigeração (com água destilada) por 24 horas destas matérias primas, diferente dos métodos tradicionais que por utilizar polpa ou suco de frutas não precisa deste remolho. Outra diferença é que, ao contrário das metodologias tradicionais, este método dispensa o uso de equipamentos como o *manifold* e a bomba a vácuo comumente utilizados no processo de extração em fase sólida de amostras,

substituídos pela utilização de seringas e vidrarias de laboratório (béqueres, balões volumétricos, etc), o que torna bastante viável sua aplicação em laboratórios de pesquisa, em função do custo de sua execução ser reduzido.

Breve descrição da Invenção

031. A presente invenção refere-se ao processo de obtenção de antocianinas purificadas a partir de resíduo (cascas e sementes) obtidas da produção de suco integral de uva cultivar Isabel (*Vitis labrusca* L.) e Magna (BRS Magna) com propriedades antioxidante, com diversas aplicações na área farmacêutica, alimentícia e cosmética.

Descrição detalhada da invenção

032. O resíduo 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'). O resíduo de uva Isabel e Magna úmido (consistiu no bagaço (casca e semente) bruto, da forma como foi coletado na indústria, onde após quarteamento da amostra foram separados em sacos plásticos, contendo 100 g cada, armazenados em local protegido da luz sob congelamento à -18 °C.

033. Para a produção de resíduo de uva Isabel e Magna em pó, após descongelamento sob refrigeração (5 °C por 24 horas), o resíduo foi desidratado em estufa de circulação de ar a 47° ± 2°C, por 8 horas, até atingir um teor de umidade abaixo de 10 %. Em seguida, foi triturado para a obtenção do RUIP e do RUMP, que após ser peneirado utilizando uma peneira de 80 *mesh* para obter uma granulometria uniforme, foi acondicionado em sacos plásticos e armazenado em temperatura de congelamento de -18°C.

034. Para extração das antocianinas, 100g de cada um dos resíduos úmidos e em pó de uvas cv. Isabel e cv. Magna, obtidos a partir do processamento de suco de uva, foram submetidos a remolho por 24 horas, sob refrigeração, com água destilada, e em seguida extraídos, com acetona acidificada (0.01% HCl) e logo em seguida filtrados até

a remoção completa das antocianinas. Os sobrenadantes resultantes foram submetidos à partição com dois volumes de clorofórmio e armazenados a $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pelo período de uma noite, a fim de possibilitar a separação das fases apolar e polar. A fase aquosa foi recolhida e submetida ao evaporador rotatório ($38^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob vácuo) para a remoção total da acetona residual, e os extratos aquosos obtidos foram armazenados a $-18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em frascos âmbar para uso em análises posteriores (RODRIGUEZ-SAONA; WROLSTAD, 2001).

035. A purificação dos extratos antociânicos aquosos obtidos foi realizada por meio de extração em fase sólida (SPE, Solid Phase Extraction), utilizando cartuchos de C18 600mg, baseado na metodologia descrita por Rodriguez-Saona e Wrolstad (2001) visando à remoção de açúcares, ácidos e outros compostos fenólicos não antociânicos.

036. Com o auxílio de seringas de plástico (5 mL), o cartucho foi previamente condicionado com 2 volumes de metanol, e em seguida com 3 volumes de água acidificada (HCl, à 0.01%). Posteriormente, o extrato aquoso foi passado pelo cartucho, e depois 2 volumes de acetato de etila foram utilizados para lavá-lo (para este solvente foi utilizada seringa de vidro, pois quando utilizado material plástico ocorrem dificuldades quanto ao manuseio). Por fim, as antocianinas retidas no cartucho foram eluídas com metanol acidificado (HCl, à 0.01%) e recolhidas em balão volumétrico.

037. O extrato metanólico resultante foi concentrado a vácuo, em rota-evaporador ($38^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), 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 ($-18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) em frascos âmbar até o momento de sua utilização.

038. 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 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 (Figura 1 - Concentração das soluções-estoque e intermediária das antocianinas em estudo).

039. O cromatograma obtido para as soluções padrão das 8 antocianinas estudadas e seus respectivos tempos de retenção estão disponíveis na Figura 2 (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).

040. A análise cromatográfica permitiu a identificação e quantificação de 8 tipos de antocianinas majoritárias presentes nas antocianinas purificadas a partir dos resíduos de uva cv. Isabel e Magna (Figura 3). A partir dos resultados obtidos, foi possível constatar que o conteúdo de antocianinas presente na fração de antocianinas purificadas obtidas dos resíduos de uva Magna seco e úmido 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 (Figura 3 - Perfil de antocianinas majoritárias quantificadas em antocianinas purificadas a partir de resíduo de suco integral de uvas Isabel e Magna através de CLAE-DAD).

041. A capacidade antioxidante total (CAT) 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. A capacidade antioxidante total foi expressa 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. Quanto a CAT, as antocianinas purificadas a partir do resíduo úmido de uva cv. Isabel e cv. Magna apresentaram valores de 50730 mg EQ AA/ mL e 61860 mg EQ AA/ mL, respectivamente, enquanto para as provenientes do resíduo seco os valores foram de 69060 mg EQ AA/ mL e 72330 mg EQ AA/ mL, também de forma respectiva (Figura 4 - Atividade antioxidante das antocianinas purificadas 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).

042. A avaliação da atividade antioxidante das antocianinas purificadas também foi realizada pelo método de sequestro de radicais livres usando o radical estável DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazil) (VERAS et al., 2020). 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. Quanto a atividade antioxidante frente ao radical DPPH, as antocianinas purificadas a partir do resíduo úmido de uva cv. Isabel e cv. Magna apresentaram valores de 31070 mg EQ Trolox/ mL e 33280 mg EQ Trolox/ mL, respectivamente, enquanto para as provenientes do resíduo seco os valores foram de 48440 mg EQ Trolox/ mL e 44410 mg EQ Trolox/ mL, também de forma respectiva (Figura 4).

043. A atividade antioxidante das antocianinas purificadas pelo ensaio ABTS (ácido 2,2'-azino-bis 3- etilbenzotiazolina-6-sulfônico) foi baseada na geração do radical cromóforo catiônico obtido a partir da oxidação do ABTS (DE VERAS et al., 2019). 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. Quanto a atividade antioxidante frente ao radical ABTS, as antocianinas purificadas a partir do resíduo úmido de uva cv. Isabel e cv. Magna apresentaram valores de 14670 mg EQ Trolox/ mL e 16360 mg EQ Trolox/ mL, respectivamente, enquanto para as provenientes do resíduo seco os valores foram de 24280 mg EQ Trolox/ mL e 22170 mg EQ Trolox/ mL, também de forma respectiva (Figura 4).

044. O poder redutor (PR) 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 [C₆N₆ FeK₃] (2,5 mL, 1%); a mistura foi incubada a 50 ° C por 20 min. 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. Quanto ao Poder Redutor, as antocianinas purificadas a partir do resíduo úmido de uva cv. Isabel e cv. Magna apresentaram valores de 4880 mg EQ AG/ mL e 3720 mg EQ AG/ mL, respectivamente, enquanto para as provenientes do resíduo seco os valores foram de 6500 mg EQ AG/ mL e 5930 mg EQ AG/ mL, também de forma respectiva (Figura 4).

REFERÊNCIAS

045. BALESTRO, E.A.; SANDRI, I.G.; FONTANA, R.C. utilização de bagaço de uva com atividade antioxidante na formulação de barra de cereais. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.13, n.2, p.203-209, 2011.

046. DALBÓ, M.A.; BETTONI, J.C.; GARDIN, J.P.P.; BASSO, C. Produtividade e qualidade de uvas da cv. Isabel (*Vitis labrusca* L.) submetidas à adubação potássica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 3, p. 789-796, 2015.

047. DE VERAS, B.O. et al. *Algrizea Minor* Sobral, Faria & Proença (Myrteae, Myrtaceae): chemical composition, antinociceptive, antimicrobial and antioxidant activity of essential oil. **Nat Prod Res**, v. 23, p. 1-5, 2019.

048. 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.

049. 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.

050. GUERRA, C.C.; MANDELLI, F.; TONIETTO, J.; ZANUS, M.C.; CAMARGO, U.A. Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos. **EMBRAPA UVA E VINHO**, 1ª ed., 2009. 69 p.

051. 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.

052. 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.

053. KALLI, E.; LAPPÀ, 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.

054. 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.

055. LOPES, L.D.; BÖGER, B.R.; CAVALLI, K.F.; SILVEIRA-JÚNIOR, J.F.S.; OSÓRIO, D.V.C.L.; OLIVEIRA, D.F.; et al. Fatty acid profile, quality lipid index and bioactive compounds of flour from grape residues. **Ciencia y Investigación Agraria**, v.41, n. 2, p.225-234, 2014.

056. 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.

057. 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.

058. MELO-SILVEIRA, R. et al. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Methanolic Extract from a Neglected Agricultural Product: Corn Cobs. **Molecules**, v.19, n.(4), p. 5360–5378, 2014.

059. RITSCHER, 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.

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

061. 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.

062. 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.

063. PRAZERES, L.D. K.T. et al. Antioxidant and Antiulcerogenic Activity of the Dry Extract of Pods of *Libidibia ferrea* Mart. ex Tul. (Fabaceae). **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Article ID 1983137, v.2019, p. 1-24, 2019.

064. 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.

065. 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.

066. VERAS, B.O. et al. Chemical composition and evaluation of the antinociceptive, antioxidant and antimicrobial effects of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (Pinto,

Mansano & Azevedo) native to Brazil: A natural medicine. **Journal of Ethnopharmacology**. 2020. doi.org/10.1016/j.jep.2019.112265

067. 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.

068. ZHAO, X.; ZHU, H.; ZHANG, G.; TANG, W. Effect of superfine grinding on the physicochemical properties and antioxidant activity of red grape pomace powders. **Powder Technology**, v.286, p.838-844, 2015.

069. 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.

070. 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.

071. ZHU, F.; DU, B.; ZHENG, L.; LI, J. Advance on the bioactivity and potential applications of dietary fibre from grape pomace. **Food Chemistry**, v.186, n.1, p. 207-212, 2015.

REIVINDICAÇÕES

- 1) Processo de obtenção de antocianinas purificadas a partir de resíduo de uva com capacidade antioxidante, **caracterizado por** obter e purificar antocianinas, a partir de resíduo agroindustrial de uva, na forma de bagaço (casca e semente) ou pó.
- 2) Processo de obtenção de antocianinas purificadas a partir de resíduo de uva com capacidade antioxidante, citado na Reivindicação 1, **caracterizado por** utilizar técnica de remolho dos resíduos com água destilada, sob refrigeração, por 24 horas.
- 3) Processo de obtenção de antocianinas purificadas a partir de resíduo de uva com capacidade antioxidante, citado nas Reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** dispensar o uso de equipamentos, como o *manifold* e a bomba a vácuo, comumente utilizados no processo de extração em fase sólida de amostras.
- 4) Processo de obtenção de antocianinas purificadas a partir de resíduo de uva com capacidade antioxidante, citado nas Reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizado por** apresentar teores de 161,99 e 171,04 mg/L de antocianinas, nos resíduos de uva Magna seco e úmido, respectivamente, e teores de 110,41 e 124,64 mg/L de antocianinas, nos resíduos seco e úmido de uva Isabel, respectivamente.
- 5) Processo de obtenção de antocianinas purificadas a partir de resíduo de uva com capacidade antioxidante, citado nas Reivindicações 1, 2, 3 e 4, **caracterizado por** apresentar antocianinas dos tipos 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), nos resíduos seco e úmido de uva Isabel e uva Magna.

6) Processo de obtenção de antocianinas purificadas a partir de resíduo de uva com capacidade antioxidante, citado nas Reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5, **caracterizado por** apresentar propriedade antioxidante.

7) Processo de obtenção de antocianinas purificadas a partir de resíduo de uva com capacidade antioxidante, citado nas Reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 e 6, **caracterizado por** apresentar atividade antioxidante, podendo ser utilizada na elaboração de produtos da indústria farmacêutica, de cosméticos e de alimentos e bebidas.

DESENHOS

Figura 1

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

Figura 2.

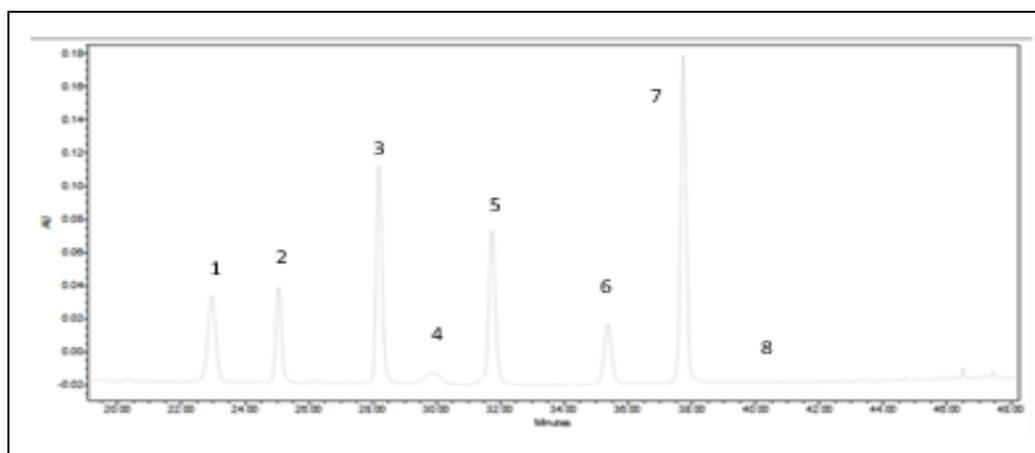


Figura 3.

Antocianinas (mg / L de diluente)	Antocianinas purificadas (mg /L de diluente)			
	Resíduo de uva Magna	Resíduo de uva Magna	Resíduo de uva Isabel	Resíduo de uva Isabel
	seco	úmido	seco	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

Figura 4.

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

RESUMO**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ANTOCIANINAS PURIFICADAS A PARTIR DE RESÍDUO DE UVA COM CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.**

A presente invenção refere-se ao processo de obtenção de antocianinas purificadas, a partir de resíduo agroindustrial de uva, na forma de bagaço ou pó, utilizando a técnica de remolho das amostras com água destilada, em refrigeração, antes de realizar a extração e purificação das antocianinas, e dispensando o uso de equipamentos como o *manifold* e a bomba a vácuo comumente utilizados no processo de extração em fase sólida. O conteúdo de antocianinas presente nos resíduos de uva Magna seco e úmido 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, apresentando as amostras propriedades antioxidantes e podendo ser utilizada elaboração de produtos na indústria farmacêutica, de cosméticos, e de alimentos e bebidas.