

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

ALINE PIVETTA

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ANTOCIANINAS
DO BAGAÇO DE UVA E ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADO**

TOLEDO, PR

2023

ALINE PIVETTA

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ANTOCIANINAS
DO BAGAÇO DA UVA E ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADO**

**Optimization of extraction of phenolic compounds and anthocyanins of grape
pomace and accelerated stability study**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Processos Químicos e Biotecnológicos, do Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos – PPGQB – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR.

Orientadora: Dra. Tatiana Shioji Tiuman.
Coorientador: Dr. Ricardo Fiori Zara.

TOLEDO, PR

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Toledo



ALINE PIVETTA

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ANTOCIANINAS DO BAGAÇO DE UVA E ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADO

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Processos Químicos E Biotecnológicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Processos Químicos E Biotecnológicos.

Data de aprovação: 28 de Setembro de 2023

Dra. Tatiana Shioji Tiuman, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Nathielle Miranda, Doutorado - Universidade Paranaense (Unipar)

Dra. Solange Maria Cottica, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 28/09/2023.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e da sabedoria, por guiar meus passos para que eu alcançasse mais este objetivo.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR – Campus Toledo e ao Programa de Pós-graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos (PPGQB) pela oportunidade de realização do mestrado, bem como, em especial à professora Dra. Tatiana Shioji Tiuman e ao professor Dr. Ricardo Fiori Zara, pelos ensinamentos e colaboração.

Também, agradeço à Elizabeth Figueiredo Pires e à Emilly Fornari, às técnicas e ao laboratório LABCA (Laboratório Multiusuário Central Analítica) e de Microbiologia da UTFPR - Toledo pelo apoio com as análises, equipamentos e preparo de materiais. Em especial, a Gabrielle Peiter e Chalissa Pawlak pelo auxílio.

Também um agradecimento, em especial, ao produtor rural do oeste do Paraná pela doação das amostras.

Aos meus familiares e amigos pela colaboração e compreensão, e a todos aqueles que não foram citados, mas que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste projeto.

"Tudo é teoricamente impossível até que
seja feito."

(MANDELA, 2001).

RESUMO

No Brasil, a maior parte do bagaço gerado na produção de vinhos é tratado como resíduo de baixo valor. Porém, este produto contém compostos fenólicos que possuem inúmeras atividades biológicas. Desta forma, diferentes métodos podem ser utilizados na extração destas substâncias, mas a maioria é onerosa e têm sido substituídas por metodologias mais sensíveis, seletivas, rápidas e seguras para o ambiente. Objetivou-se otimizar a extração de compostos fenólicos e antocianinas utilizando sistema de ultrassom, a partir do bagaço de uva, e realizar um estudo de estabilidade acelerado. O bagaço foi obtido a partir da produção de vinho da uva Bordô, espécie *Vitis labrusca*, e em seguida, foi liofilizado, moído e submetido a extração assistida por ultrassom. Os fatores avaliados no delineamento experimental foram a concentração de etanol (0 a 70 %), a concentração de ácido cítrico adicionada à solução (0 a 4 %), a potência de ultrassom (1000 a 4500 W/L) e a concentração de massa (1 a 15 %), totalizando 28 ensaios. Dentre as condições avaliadas, através das análises de antocianinas monoméricas e compostos fenólicos a extração mais eficiente ocorreu quando foram aplicadas 3838 W L⁻¹ de potência, 3,24 % de ácido cítrico, etanol 70 % e concentração de massa de 1 %. No extrato otimizado o teor de antocianinas e fenólicos foi de 16,76 ± 2,31 mg equivalente a malvidina-3-glicosídeo e 65,15 ± 4,35 mg equivalente a ácido gálico por grama de resíduo, respectivamente. Além disso, foram determinadas as atividades antioxidante, com resultado de 43,70 ± 6,25 µmol equivalente Trolox g⁻¹ por ABTS e 205,73 ± 10,41 µmol de Fe (II) g⁻¹ por FRAP, e antimicrobiana, onde observou-se atividade inibitória contra bactérias Gram positivas e negativas. Foi determinada a presença de resveratrol por cromatografia líquida de alta eficiência. Realizou-se um estudo de estabilidade, no qual verificou-se que o extrato líquido concentrado se manteve estável por 35 dias. Quando utilizado como adjuvante alimentício, propiciou uma estabilidade prolongada ao produto alimentício tipo iogurte, em que foi aplicado, comparando-se com o mesmo sem a adição de extrato. Portanto, o uso de sistema ultrassom demonstrou ser uma alternativa adequada para a extração de compostos fenólicos e antocianinas a partir do bagaço da uva *Vitis labrusca*, onde o extrato obtido se mostrou como um promissor antioxidante e conservante e que pode ser utilizado de forma segura e sustentável em produtos alimentícios.

Palavras-chave: produto secundário da uva; sistema ultrassônico; bioatividade; alimento vegano; estudo de armazenamento.

ABSTRACT

In Brazil, most of the pomace generated in wine production is treated as low-value waste. However, this product contains phenolic compounds that have numerous biological activities. In this way, different methods can be used in the extraction of these substances, but most are costly and have been replaced by more sensitive, selective, fast, and environmentally safe methodologies. The objective of this study was to optimize the extraction of phenolic compounds and anthocyanins using an ultrasound system from grape pomace and to perform an accelerated stability study. The pomace was obtained from the wine production of the Bordeaux grape, *Vitis labrusca* species, and then it was lyophilized, ground, and submitted to ultrasound-assisted extraction. The factors evaluated in the experimental design were the concentration of ethanol (0 to 70 %), the concentration of citric acid added to the solution (0 to 4 %), the ultrasound power (1000 to 4500 W/L), and the mass concentration (1 to 15 %), totaling 28 trials. Among the conditions evaluated, through the analysis of monomeric anthocyanins and phenolic compounds, the most efficient extraction occurred when 3838 W L⁻¹ of power, 3.24 % citric acid, 70 % ethanol, and mass concentration of 1 % were applied. In the optimized extract, the anthocyanin and phenolic content was 16.76 ± 2.31 mg malvidin-3-glycoside equivalent and 65.15 ± 4.35 mg gallic acid equivalent per gram of residue, respectively. In addition, antioxidant activities were determined, with results of 43.70 ± 6.25 μmol Trolox g⁻¹ equivalent by ABTS and 205.73 ± 10.41 μmol of Fe (II) g⁻¹ by FRAP, and antimicrobial, where inhibitory activity against Gram-positive and negative bacteria was observed. The presence of resveratrol was determined by high-performance liquid chromatography. A stability study was carried out and was verified that the concentrated liquid extract remained stable for 35 days. When used as a food adjuvant, it provided prolonged stability to the yogurt-like food product, in which it was applied, compared with it without the addition of extract. Therefore, the use of an ultrasound system proved to be a suitable alternative for the extraction of phenolic compounds and anthocyanins from the pomace of the *Vitis labrusca* grape, where the extract obtained proved to be a promising antioxidant and con-servant and that can be used safely and sustainably in food products.

Keywords: grape secondary product; ultrasonic system; bioactivity; vegan food; storage study.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Espécie <i>Vitis labrusca in natura</i> | 17 |
| Figura 2 - Fórmula estrutural básica dos compostos fenólicos..... | 18 |
| Figura 3 - Classificação dos compostos fenólicos..... | 19 |
| Figura 4 - Estrutura química do resveratrol | 20 |
| Figura 5 - Estrutura química dos flavonoides | 21 |
| Figura 6 - Estrutura básica das antocianinas | 23 |
| Figura 7 - Equilíbrio das antocianinas em solução aquosa | 24 |
| Figura 8 - Diagrama demonstrando a cavitação de bolhas através do uso da ponteira ultrassônica | 32 |
| Figura 9 - Fluxograma da sequência de preparos e experimentos realizados para os extratos do bagaço de uva Bordô..... | 38 |
| Figura 10 - A) Gráfico de normalidade de resíduo para teor de compostos fenólicos. B) Gráfico resíduo x preditivo para teor de compostos fenólicos. C) Superfície de resposta para compostos fenólicos. D) Superfície de resposta 3D para compostos fenólicos..... | 51 |
| Figura 11 - A) Gráfico de normalidade de resíduo para teor de antocianinas monoméricas. B) Gráfico resíduo x preditivo para teor de antocianinas monoméricas. C) Superfície de resposta para antocianinas monoméricas. D) Superfície de resposta 3D para antocianinas monoméricas..... | 55 |
| Figura 12 - Análises de sólidos solúveis totais (°Brix), pH, condutividade (mS cm^{-1}) e acidez por titulação (%) nos tempos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias na condição de temperatura de armazenamento de 35 °C. | 65 |
| Figura 13 - Resultados das análises de compostos fenólicos, antocianinas monoméricas e ABTS nos tempos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias na condição de temperatura de armazenamento de 35°C. | 67 |
| Figura 14 - Resultados da determinação da presença de Resveratrol nos tempos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias na condição de temperatura de armazenamento de 35 °C..... | 68 |
| Figura 15 - Resultados de pH (A), acidez titulável (mL de solução M % v/m) (B), sólidos solúveis totais (°Brix) (C) e condutividade (mS cm^{-1}) (D) para as formulações do produto alimentício tipo iogurte com ácido cítrico (controle negativo) e com aplicação do extrato líquido concentrado do bagaço da uva, no estudo de estabilidade sob temperatura de 4 e 35 °C, nos tempos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias. (Continua)..... | 70 |

| | |
|---|----|
| Figura 16 - Comportamento da estabilidade de compostos para as amostras iogurte controle negativo (C-) e iogurte com extrato (E), nos tempos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias, sob armazenamento de 4 e 35°C..... | 73 |
| Figura 17 - Comportamento da estabilidade de antocianinas monoméricas para as amostras de iogurte com extrato (E), nos tempos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias, sob armazenamento de 4 e 35°C..... | 73 |
| Figura 18 - Reação de formação estrutural das antocianinas..... | 75 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Testes obtidos com o planejamento experimental variáveis não codificadas | 37 |
| Tabela 2 - Composição do iogurte vegano..... | 39 |
| Tabela 3 - Condições cromatográficas utilizadas para determinação da presença do composto resveratrol na amostra de extrato líquido concentrado do bagaço da uva submetido ao estudo de estabilidade com armazenamento de 35 dias sob temperatura de 35 °C. | 47 |
| Tabela 4 - Resultados para antocianinas e compostos fenólicos totais dos extratos obtidos do resíduo de bagaço de uva nas diferentes condições do planejamento experimental..... | 48 |
| Tabela 5 - Resultados ANOVA para o teor de compostos fenólicos. | 49 |
| Tabela 6 - R ² obtido para o teor de compostos fenólicos. | 50 |
| Tabela 7 - Resultados ANOVA para o teor de antocianinas monoméricas. | 53 |
| Tabela 8 - R ² para o teor de antocianinas monoméricas..... | 53 |
| Tabela 9 - Resultados para antocianinas monoméricas, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (ABTS e FRAP) nas condições otimizadas de extração por sistema de ultrassom do extrato otimizado previsto e obtido e do controle de ácido cítrico..... | 56 |
| Tabela 10 - Resultados para concentração inibitória mínima - CIM, concentração bactericida mínima - CBM e concentração fúngica mínima – CFM para o extrato líquido concentrado do bagaço de uva Bordô (Uva), para o ácido cítrico (C-) e para os controles positivos de Ampicilina (Amp) (para bactérias) e Nistatina (Nist) (para leveduras)..... | 62 |
| Tabela 11 - Análise das características organolépticas da amostra do extrato otimizado concentrado no tempo zero dias e após 35 dias de estudo de estabilidade, armazenado sob temperatura 35 °C, onde são avaliadas as características de cor, odor e aspecto..... | 66 |
| Tabela 12 - Comparação dos resultados de teor de compostos fenólicos (CF), teor de antocianinas monoméricas (AM) e atividade antioxidante (ABTS) obtidos no estudo de García (2019) e no presente estudo no tempo zero dias e no tempo 35 dias. | 67 |
| Tabela 13 - Análise visual das formulações do controle do produto alimentício tipo iogurte e do produto alimentício adicionado com o extrato líquido concentrado nas condições de armazenamento de 4 °C e 35 °C, nos tempos zero e 35 dias..... | 76 |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 | OBJETIVOS | 16 |
| 2.1 | Objetivo geral | 16 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 16 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 3.1 | Uva | 17 |
| 3.2 | Compostos fenólicos | 18 |
| 3.2.1 | Não flavonoides | 19 |
| 3.2.2 | Flavonoides | 20 |
| 3.3 | Radicais livres | 25 |
| 3.4 | Atividade antioxidante | 26 |
| 3.4.1 | Classificação dos Antioxidantes | 27 |
| 3.4.2 | Origem dos antioxidantes | 27 |
| 3.5 | Atividade antimicrobiana | 29 |
| 3.6 | Extração assistida por ultrassom | 30 |
| 3.7 | Aplicação de extratos naturais na alimentação vegana | 33 |
| 3.8 | Estudo de estabilidade | 34 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 36 |
| 4.1 | Amostragem | 36 |
| 4.2 | Otimização da extração por ultrassom | 36 |
| 4.2.1 | Otimização da extração | 36 |
| 4.2.2 | Preparo do extrato otimizado..... | 37 |
| 4.3 | Estudo de estabilidade acelerado | 39 |
| 4.3.1 | Estudo de estabilidade acelerado do extrato líquido concentrado..... | 39 |
| 4.3.2 | Aplicação e estabilidade do extrato líquido concentrado em um produto alimentício | 39 |
| 4.3.2.1 | Elaboração do produto alimentício tipo iogurte | 39 |
| 4.4 | Métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante | 40 |
| 4.4.1 | Compostos fenólicos totais | 40 |
| 4.4.2 | Análise de antocianinas monoméricas por pH diferencial | 41 |
| 4.4.3 | Captura do radical livre ABTS | 42 |
| 4.4.4 | Poder de capacidade de redução férrica (FRAP) | 42 |
| 4.5 | Métodos para determinação da atividade antimicrobiana | 43 |
| 4.5.1 | Microrganismos e cultura | 43 |
| 4.5.2 | Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)..... | 43 |
| 4.5.3 | Determinação da concentração bactericida e fúngica mínima (CBM e CFM) | 44 |
| 4.5.4 | Determinação da presença de coliformes totais e termotolerantes | 44 |
| 4.6 | Métodos para determinação das características físico-químicas | 45 |
| 4.7 | Estudo de estabilidade de resveratrol determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC/CLAE) | 46 |
| 4.8 | Análise estatística | 47 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 48 |
| 5.1 | Otimização da extração por ultrassom | 48 |
| 5.1.1 | Compostos fenólicos | 49 |
| 5.1.2 | Antocianinas monoméricas..... | 52 |
| 5.1.3 | Correlação entre compostos fenólicos e antocianinas monoméricas | 54 |
| 5.2 | Extrato otimizado | 56 |
| 5.3 | Estudo de estabilidade do extrato líquido concentrado | 63 |

| | | |
|-----|---|----|
| 5.4 | Estudo de estabilidade da aplicação em um produto alimentício | 69 |
| 6 | CONCLUSÃO | 77 |
| | REFERÊNCIAS..... | 78 |

1 INTRODUÇÃO

A uva é o fruto advindo da videira (*Vitis sp.*) e seu cultivo foi implementado no Brasil, com a chegada de imigrantes italianos no século XIX. Seu uso pode ser atribuído ao consumo *in natura* ou na produção de sucos, néctares, polpas, vinhos e entre outros (GUERRA *et al.*, 2009). Para a safra 2021/2022, segundo o IBGE, a estimativa no Brasil foi de 1.748.197 toneladas de uvas produzidas com um valor de R\$ 4.266.432,00 (x 1000), área de colheita de 75.730 hectares, área colhida de 75.622 hectares e rendimento médio de 23.118 kg/hectares.

Por se tratar de uma atividade socioeconômica de grande importância, a mesma deve ser estimulada no país, principalmente porque existem milhares de variedades pelo mundo e as mesmas apresentam benefícios tanto por suas propriedades biológicas quanto por sua importância econômica. Uma espécie de uva, amplamente discutida, sobre suas propriedades biológicas e pela sua facilidade de cultivo é a *Vitis labrusca*, esta é a principal cultivar de uvas presentes no sul do Brasil (DALBÓ *et al.*, 2015) e tem seu valor comercial agregado tanto na forma *in natura* quanto processada.

Durante o processamento da uva para a produção de vinhos e sucos, as cascas, o talo e as sementes, são descartados na forma de bagaço da uva. Este é tratado como resíduo de baixo valor agregado, entretanto retém muitos compostos fenólicos, possuindo uma quantidade de 60 a 70 % nas sementes e de 20 a 30 % nas cascas (MONRAD *et al.*, 2010).

Para a extração destes compostos fenólicos, diferentes sistemas de extração são utilizados. Muitas vezes os métodos convencionais são caros e requerem perigosos solventes orgânicos, procedimento analítico longo, temperaturas altas, exposição à luz e ao oxigênio. Isso pode ocasionar degradações, comprometendo a qualidade e o rendimento do extrato final (ASPÉ; FERNÁNDEZ, 2011).

Assim, os métodos de extração convencionais têm sido remodelados, através do uso de metodologias que são mais precisas, seletivas, ágeis e seguras para o ambiente. Técnicas como, a extração com auxílio de ultrassom, tem sido aplicada na obtenção de compostos fenólicos (DAI; MUMPER, 2010). Desta forma, essas substâncias químicas podem ser extraídas de diferentes matrizes, possuindo diferentes mecanismos de atuação e funções orgânicas, como alta atividade antioxidante e antimicrobiana (CRUZ, 2014).

Os antioxidantes são utilizados como estabilizadores de preparações para atenuar os processos oxidativos. Já os antimicrobianos inibem no produto o crescimento de microrganismos, evitando deteriorações causadas por bactérias, fungos e leveduras, influenciando assim, na estabilidade de produtos, como alimentos, cosméticos e medicamentos (ALLEN Jr. *et al.*, 2007).

Para tanto, apesar dos adjuvantes antioxidantes e antimicrobianos serem utilizados nas indústrias para aumentar o tempo de vida de prateleira dos alimentos, os mesmos são essencialmente sintéticos, e estes podem causar efeitos danosos por conta da sua inocuidade e toxidez, e isso faz com que a busca por alimentos saudáveis tenha aumentado a demanda por produtos naturais (SILVA *et al.*, 2022).

A conscientização em relação à proteção ambiental, saúde, estilo de vida e pontos de vista políticos seriam alguns dos fatores responsáveis por essas transformações em relação ao consumo (RUBY, 2012), destacando-se a forma de vida do veganismo.

Junto à crescente busca de produtos de cunho sustentável, as tecnologias emergentes buscam a utilização de antioxidantes e conservantes extraídos diretamente de fontes naturais, em particular de resíduos agroindustriais, para assim prolongar a vida de prateleira dos produtos. Tendo como base as limitações dos compostos sintéticos, a indústria tende a criar produtos de origem natural que possam suprir as substâncias sintéticas que previnem a oxidação e contaminação microbiana de alimentos, cosméticos e medicamentos.

Portanto, os subprodutos da produção de vinho, despertam grande interesse, devido a presença de compostos fenólicos com potencial aplicação como agentes preventivos contra o câncer e doenças cardiovasculares, além das suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas (TORRES; BOBET, 2001), que influenciam no aumento da vida útil de muitos produtos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Otimizar a extração de compostos fenólicos e antocianinas, do bagaço de uva da espécie *Vitis labrusca* e avaliar sua estabilidade.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a otimização do processo de obtenção de extratos de bagaço de uva (*Vitis labrusca*) por ultrassom;
- Determinar o teor de compostos fenólicos e de antocianinas nos extratos obtidos;
- Correlacionar a quantidade de compostos fenólicos e antocianinas obtidos nos extratos;
- Estabelecer o ponto ótimo de extração de compostos fenólicos e antocianinas;
- Quantificar o potencial antioxidante do extrato otimizado de uva
- Analisar a atividade antimicrobiana do extrato do bagaço de uva;
- Aplicar o extrato em um alimento, fomentando sua utilização como adjuvante alimentício;
- Realizar estudo de estabilidade acelerado do extrato de bagaço de uva e do alimento preparado com o extrato.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Uva

No Brasil, o mercado viticultor, pode ser dividido em uvas para consumo *in natura* e uvas para elaboração de suco de uva e vinhos. Esta produção apresenta características regionais distintas, com particularidades no ciclo de produção, época de colheita, cultivares, tratos culturais, tipo de produto e foco de mercado (MELLO; MACHADO, 2020).

A videira pertence à família Vitaceae e compreende 15 gêneros e 850 espécies, sendo o gênero *Vitis* o mais antigo, de maior importância econômica e que possui maior seleção de frutos comestíveis (PEREIRA *et al.*, 2022). Há uma grande diversidade genética na Ásia, Europa e América, com espécies adaptadas a diferentes condições ambientais. São mais de 120 cultivares de uvas europeias, como a *Vitis vinifera*, e mais de 40 cultivares de uvas americanas, como a *Vitis labrusca*, *Vitis bourquina* e de outras espécies híbridas (CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011).

As uvas da espécie *Vitis labrusca* são utilizadas para consumo *in natura* (Figura 1) e para processamento. Pertencentes a esta espécie estão as cultivares tintas Isabel, Concord e Bordô, sendo a Bordô cultivada principalmente para produção de vinho tinto, suco, vinagre, geleias e consumida *in natura* (CAMARGO, 2012; RIZZON *et al.*, 2000).

Figura 1 - Espécie *Vitis labrusca in natura*.



Fonte: RITSCHHEL (2013)

Na produção de vinhos tintos, a partir da uva Bordô, por exemplo, as bagas esmagadas seguem para a fermentação junto com o mosto, no qual as leveduras adicionadas transformarão os açúcares em etanol e subprodutos, levando de 4 a 6 dias (GUERRA *et al.*, 2009).

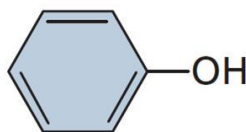
Entretanto, com o processamento de vinho, são geradas grandes quantidades de resíduos, cerca de 60 % do volume processado é representado pelo bagaço (constituído de casca, semente e engaço) (FUTIGAMI, 2021).

O bagaço de uva é caracterizado por altos teores fenólicos devido à má extração durante a vinificação. Os principais constituintes fenólicos do bagaço de uva são as antocianinas, catequinas, flavonoides, ácidos fenólicos e estilbenos. Os compostos fenólicos possuem conhecido efeito antioxidante, os quais promovem benefícios à saúde, possuindo aplicação, por exemplo, em indústrias farmacêuticas, cosméticas e de alimentos (KAMMERER *et al.*, 2004).

3.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são formados pelo metabolismo secundário das plantas, em condições de estresse como infecções, ferimentos e radiações UV, e são essenciais para o crescimento e reprodução das plantas (NACZK; SHAHIDI, 2004). Essas substâncias possuem pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila, chamado então de fenol (Figura 2) (PERES, s.d.; VIZZOTO *et al.*, 2010).

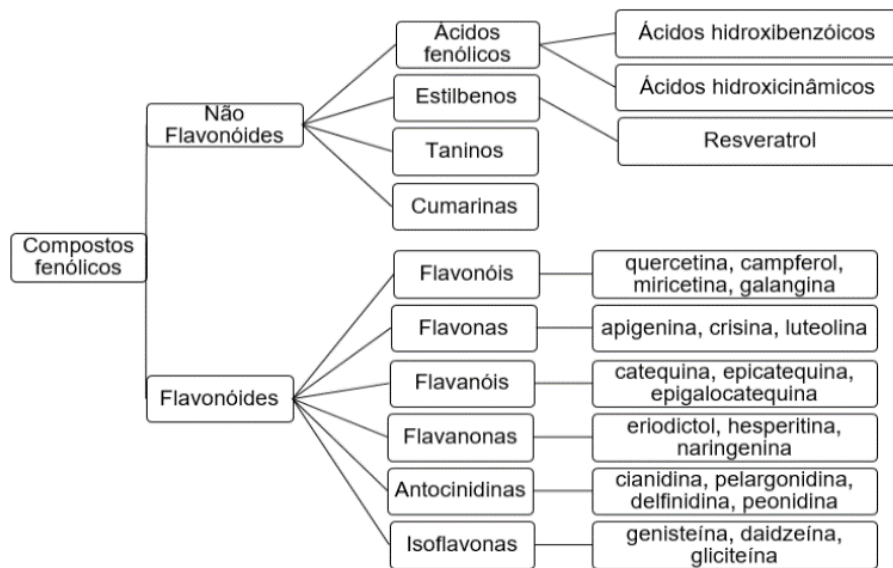
Figura 2 - Fórmula estrutural básica dos compostos fenólicos.



Fonte: Taiz et al., 2017

Esta classe apresenta uma vasta heterogeneidade e podem ser classificados em flavonoides (polifenóis) e não-flavonoides (fenóis simples ou ácidos) (SILVA *et al.*, 2010), como visto na Figura 3.

Figura 3 - Classificação dos compostos fenólicos



Fonte: LEAL *et al.* (2017)

3.2.1 Não flavonoides

Os não flavonoides possuem atividade antioxidante relacionada com a posição dos grupos hidroxilas e também com a proximidade do grupo $-\text{CO}_2\text{H}$ em relação ao grupo fenil. Quanto mais próximo esse grupo estiver do grupo fenil, maior será a capacidade antioxidante do grupo hidroxila na posição meta (HRAZDINA; BORZELL; ROBINSON, 1970; SILVA *et al.*, 2010). Os mesmos foram identificados nas folhas de uva, semente, casca e polpa, além do bagaço sendo que seus teores diminuem consideravelmente na fermentação e, em menor intensidade, durante o envelhecimento (FENG *et al.*, 2023)

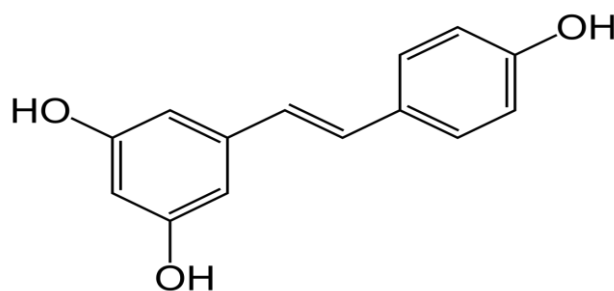
Neste grupo estão os ácidos fenólicos, presentes em grande quantidade no bagaço da uva. Estes podem ser divididos em ácidos hidroxicinâmico e ácidos hidroxibenzoicos, onde na classe dos ácidos hidroxicinâmico estão presentes os ácidos: gálico, cafeico, p-cumarico, clorogênico, ferúlico e sinápico, e compostos aromáticos com uma cadeia lateral de três carbonos. E no grupo dos ácidos hidroxibenzoicos, estão incluídos os ácidos protocatecúico, vanílico e os ácidos p-hidroxibenzoico (BERES *et al.*, 2017).

Outros compostos pertencentes ao grupo dos não flavonoides, são os estilbenos, que são fitoalexinas. Os estilbenos podem ser monoméricos, como o resveratrol, oxiresveratrol, pterostilbeno, piceatanol, isoraptigenina e cis-estilbeno, combretastatina A-4, ou oligoméricos, os quais são obtidos pelo acoplamento entre

estilbenos monomérico, cujas estruturas são complexas (PUERTO RODRÍGUEZ, 2019).

O resveratrol, principal composto bioativo presente no bagaço da uva, (Figura 4) pode ser encontrado na forma glicosiladas e isoméricas e na forma de cis e dímeros trans resveratrol. (FLAMINI *et al.*, 2013). Possuindo baixo peso molecular, este promove a capacidade de inibir o progresso de infecções em algumas plantas, assim o resveratrol apresenta alta atividade antimicrobiana (fitoalexina). Sua produção ocorre também devido a fatores estressantes que ativam um mecanismo de resistência, tais como parasitas, fungos, infecções, radiação UV e substâncias químicas (JEANDET *et al.*, 2002, 2012; BRITO, 2016).

Figura 4 - Estrutura química do resveratrol



Fonte: PUERTO RODRÍGUEZ (2019)

Os taninos são compostos, que também pertencem aos não flavonoides, e que podem ser hidrolisáveis ou condensados. Os taninos condensados estão presentes bagaço de uva, na forma dos polímeros de catequina ou leucoantocianidina. Os principais taninos encontrados no bagaço de uva são a quercetina, isoramnetina, miricetina e kaempferol (BERES *et al.*, 2017).

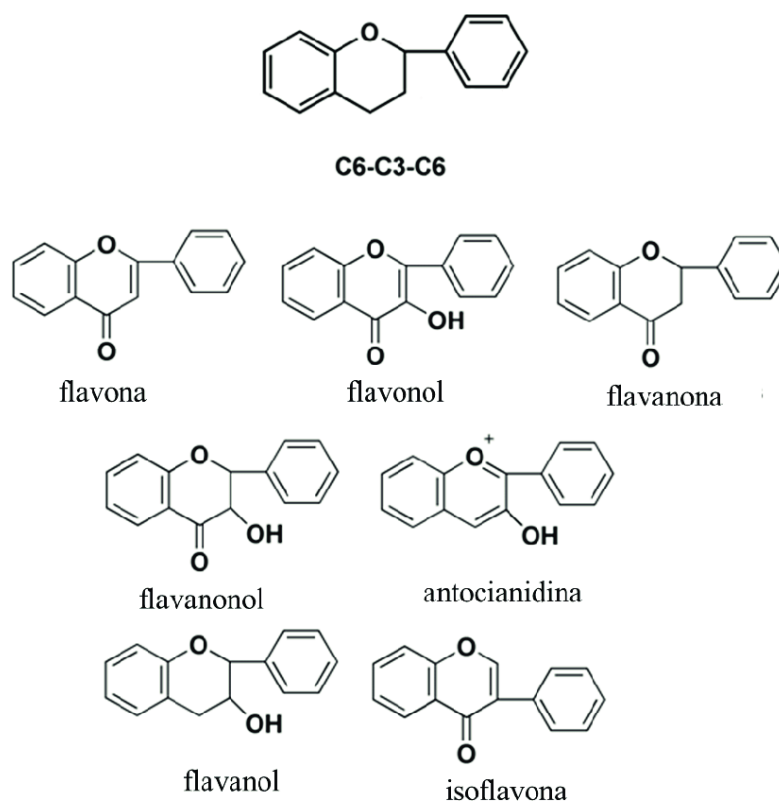
Por fim, as cumarinas, que também são compostos não flavonoides e são classificadas como benzopironas (MIRANDA, 2001), são antioxidantes e inibidores de enzimas, controlam o crescimento das plantas, a respiração e a fotossíntese. São dotados de sabor amargo e uma fração de óleos essenciais, que potencializam as plantas contra os ataques de predadores e atraem polinizadores por meio do perfume (MAIA *et al.*, 2023).

3.2.2 Flavonoides

Os flavonoides, constituintes do segundo grupo de compostos fenólicos, constituem-se, no seu esqueleto básico, de substâncias aromáticas com 15 átomos

de carbono (C₁₅), que possuem nessa estrutura anéis aromáticos C₆-C₃-C₆ (Figura 5) (YOKOZAWA *et al.*, 1997; LOPES *et al.*, 2010).

Figura 5 - Estrutura química dos flavonoides



Fonte: MAGALHÃES; SANTOS (2021)

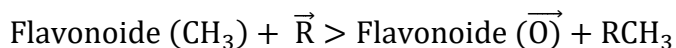
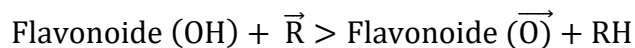
Possuem importantes propriedades farmacológicas, como: propriedades antitumoral, anti-inflamatória, antiviral, antioxidante, dentre outras, bem como, nas plantas possuem ações relacionadas a capacidade de atração de animais polinizadores e proteção contra raios ultravioleta, contra insetos, fungos, vírus e bactérias (SANTOS; RODRIGUES, 2017).

A atividade antioxidante dos flavonoides é consequência das suas propriedades de óxido-redução, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Quimicamente, os flavonoides e isoflavonoides são doadores de elétrons. Eles apresentam estruturas químicas em anel β conjugadas, com grande número de grupos hidroxilas, que possui potencial antioxidante por reagirem e inativarem ânions superóxido, oxigênio singlete, radicais peróxidos de lipídios e/ou estabilizando radicais

livres envolvidos no processo oxidativo através da hidrogenação ou complexação com espécies oxidantes (BIRT; HENDRICH; WANG, 2001; MACHADO *et al.* 2008).

A ação antioxidante dos flavonoides é desempenhada de acordo com o esquema abaixo:



Os flavonoides podem ser classificados como: flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanóis e antocianinas, e estão presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de plantas (AHERNE; O'BRIEN, 2002).

Na uva, durante o período de vinificação os compostos flavonoides afetam a coloração e a copigmentação do vinho. A antocianina confere a cor do vinho, flavonol-3-ol é responsável pela copigmentação e a proantocianidina responsável pela amargura e adstringência no resultado do vinho (CHEN *et al.*, 2018). Entretanto grande parte das proantocianidinas permanecem no bagaço de uva após o processo de vinificação. Na casca ou pele da uva podem ser encontrados flavonóides como as proantocianidinas e nas sementes são encontradas maiores quantidades de procianidinas (BERES *et al.*, 2017).

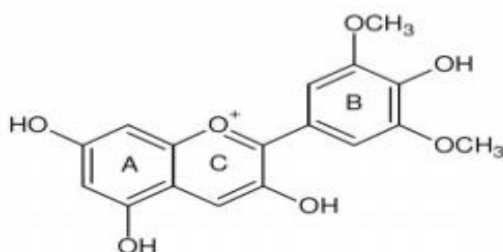
Assim, sabe-se que as antocianinas são os principais pigmentos naturais responsáveis pela coloração vermelha e roxa de flores e frutos, as mesmas são derivadas das antocianidinas. A maioria dessas antocianidinas possui hidroxilas nas posições 3, 5 e 7 (Figura 5) e não possuem grupos glicosídeos. Já nas antocianinas, uma ou mais destas hidroxilas estão ligadas a açúcares, conferindo maior solubilidade e estabilidade a estes pigmentos, quando comparados com as antocianidinas (TERCI, 2004).

As antocianinas e proantocianidinas são pigmentos valiosos e várias abordagens de engenharia metabólica com foco nesses têm sido realizadas, pois os mesmos são protetores de estresse e componentes de promoção da saúde por causa de sua potente atividade antioxidante (SAIGO *et al.*, 2020).

As antocianinas apresentam uma estrutura fundamental, C₆-C₃-C₆ (Figura 5). Tais, são capazes de absorver fortemente a luz na região do espectro visível, conferindo uma ampla gama de cores entre o laranja, o vermelho, a púrpura e o azul, dependendo do meio em que se encontrem (BUENO *et al.*, 2012). Em meio ácido elas

são vermelhas, como é o caso dos sucos de uva tinta e vinhos, e em meio alcalino adquirem coloração azul ou violeta (RIZZON, 2006).

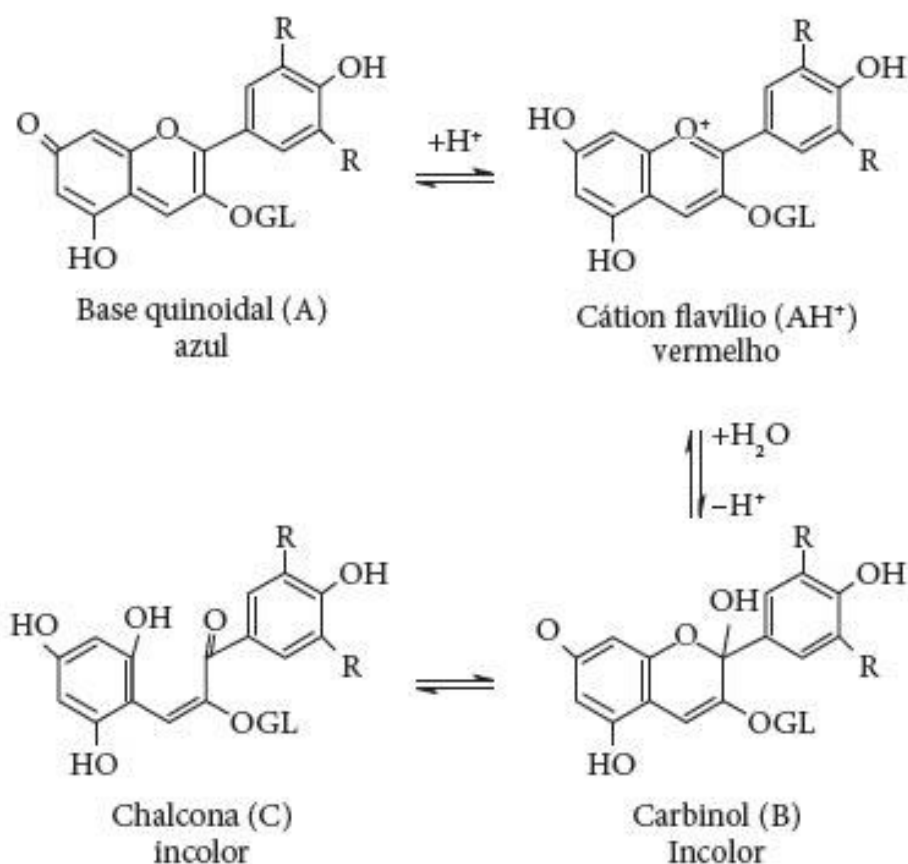
Figura 6 - Estrutura básica das antocianinas



Fonte: ROCKENBACH (2011)

Uma característica marcante das antocianinas está no fato de que em soluções aquosas, apresentam estruturas em função do pH. Conforme a Figura 7, em meio extremamente ácido (pH entre 1 e 2), as antocianinas apresentam coloração avermelhada devido ao predomínio da forma cátion flavílico (AH^+). Para um meio com pH maior que 2, é observado um equilíbrio entre o cátion flavílico e uma estrutura conhecida como pseudobase carbinol (B). Com o aumento do pH, as antocianinas perdem a cor até se tornarem praticamente incolores em pH em aproximadamente 6, devido à predominância da espécie pseudobase carbinol. Em valores de pH acima de 6,0, tanto uma estrutura pseudobase carbinol quanto anidrobases quinóide (A) podem formar uma espécie *cis*-chalcona (C_c). Ao iniciar-se a ionização das antocianinas, são formadas estruturas de anidrobases que exibem coloração azul. Em meio extremamente alcalino, observa-se uma estrutura coloração amarelada, devido ao equilíbrio entre formas ionizadas de chalconas *cis* e *trans* (TERCI; ROSSI, 2002; BOBBIO; BOBBIO, 2001; MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008). As antocianinas têm uma grande desvantagem, nomeadamente a sua baixa estabilidade. Assim, sua estabilidade é influenciada por diversos fatores como pH, luz, temperatura, copigmentação, sulfitos, ácido ascórbico, oxigênio e enzimas (ENARU *et al.*, 2021).

Figura 7 - Equilíbrio das antocianinas em solução aquosa



Fonte: (BORDIGNON JR., 2009)

Além das antocianinas, o bagaço da uva também é uma fonte rica em outros polifenóis que promovem vários benefícios antioxidantes, como as flavonas (MOHAMMAD, 2019) que atuam como mediadores na interação das plantas com os micro-organismos simbiotes fixadores de nitrogênio. As flavonas absorvem na faixa do ultravioleta, repelindo todo o restante do espectro da luz solar, resultando na coloração branca e amarela em algumas flores (FERREIRA; OLIVEIRA; SANTOS, 2008).

Já os flavonóis constituem um grupo altamente complexo de polifenóis, possuem dois átomos de carbono assimétricos (C₂ e C₃) que são responsáveis pela existência de quatro isômeros para cada molécula de flavan-3-ol (DAS; GOUD; DAS, 2019). Dentro da classe dos flavanóis temos os flavanóis monoméricos (catequina, epicatequina, epigalocatequina, galocatequina e seus derivados de galato) e seus produtos de polimerização (proantocianidina) (BONETTI; BROMBO; ZULIANI, 2017). As proantocianinas são muito importantes nas características sensoriais do vinho, entretanto a maior parte desses compostos permanecem no bagaço de uva após o

processo de vinificação. Na casca ou pele da uva podem ser encontradas as catequinas, galocatequinas e proantocianidinas e nas sementes, em maiores quantidades, são encontradas catequinas e procianidinas (BERES *et al.*, 2017).

Por fim, tem-se as flavanonas que são caracterizadas pela presença de uma cadeia saturada de três carbonos e um átomo de oxigênio no C₄ e são glicosilados, normalmente, por um dissacarídeo em C₇ (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007). As mesmas possuem atividade antioxidante, mas estão presentes em menor quantidade nas uvas, assim como as isoflavonas, que são de ocorrência natural e consistem em uma estrutura molecular de 3-fenilcromeno-4-ona, e são amplamente distribuídos no reino vegetal, particularmente na família *Fabaceae*. As isoflavonas típicas demonstraram estar associados a boas capacidades antioxidantes devido às suas atividades de eliminação de radicais (NINH THE; DO MINH; NGUYEN VAN, 2019).

Desta forma, os compostos fenólicos são de suma importância devido a sua variedade de classes, possuindo inúmeros benefícios por meio de seus compostos bioativos. Assim, para que estes compostos bioativos se tornem disponíveis, os mesmos devem ser extraídos das matrizes vegetais de forma que mantenham seu grau de concentração e de atividade, principalmente, mantendo suas características antioxidantes, que promove a ação contra radicais livres.

Os compostos fenólicos possuem propriedades antioxidantes consideráveis que promovem a extinção de radicais livres, a doação de hidrogênio, a quebra de reações em cadeia de radicais e ainda a eliminação oxigênio singlete *in vitro* e *in vivo* (MENG *et al.*, 2012).

3.3 Radicais livres

Os radicais livres são moléculas que apresentam um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, assim, podem ser definidos como espécies que contêm um ou mais elétrons não pareados em orbitais atômicos ou moleculares, o qual geralmente confere um considerável grau de reatividade (LIMA; BEZERRA, 2012; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VALKO *et al.*, 2007).

As reações de oxidação-redução são o meio para a formação de radicais livres, pois causam ou se resultam dessa forma de reação. O radical livre pode oxidar-se e doar o elétron desemparelhado ou reduzir-se e ganhar um elétron, o que faz com que os mesmos alterem a configuração, estrutura ou funções de vários componentes

celulares de diferentes organismos (LIMA; BEZERRA, 2012; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VALKO *et al.*, 2007).

Derivada da formação de radicais livres, a autooxidação é o principal mecanismo de oxidação das gorduras e está associada à reação do oxigênio com ácidos graxos insaturados, consistindo em três fases: iniciação, propagação e terminação (SCHAICH, 2005; ARAUJO; MOREIRA; CARNELOSSI, 2020).

Na iniciação, há supressão de um átomo de hidrogênio do carbono na molécula de ácido graxo, formando radicais livres. Já na propagação, os radicais livres formados na primeira etapa sofrem ataque do oxigênio presente no ar, formando peróxidos, que reagem com ácidos graxos formando hidroperóxidos. Por fim, na etapa de terminação, há a combinação dos radicais formados nas duas primeiras etapas, formando produtos secundários estáveis (produtos de oxidação secundária) obtidos por cisão e rearranjo de peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis) (TOLEDO *et al.*, 1985; RAMALHO; JORGE, 2006; SILVA, 2021).

Através deste mecanismo, os lipídios podem tornar-se rançosos em função da oxidação, o que também, resulta em perdas nutricionais e/ou sensoriais devido à formação de produtos tóxicos à saúde humana, assim como à degradação dos compostos bioativos dos produtos (MORGADO, 2022).

Assim, a oxidação lipídica pode ser inibida ou retardada pela presença de antioxidantes na formulação, na sua maioria, estes adjuvantes são de origem sintética, de acordo com as propriedades protetoras de cada molécula em diferentes estágios de oxidação (MORGADO, 2022). Para tanto, há um fomento notável, buscando a utilização de adjuvantes de origem natural, por parte tanto da indústria farmacêutica, quanto cosmética, com a finalidade de atender as demandas do mercado (LANGE; HEBERLÉ; MILÃO, 2009).

Devido as inúmeras propriedades dos compostos fenólicos, os antioxidantes naturais oriundos do bagaço de uva podem proteger os componentes dos alimentos da oxidação no processamento e armazenamento de produtos como alimentos, cosméticos e medicamentos (BERES *et al.*, 2017).

3.4 Atividade antioxidante

Um antioxidante pode ser determinado como "qualquer substância que, quando em baixas concentrações, em comparação com as do substrato oxidável,

retarda significativamente ou inibe a oxidação do referido substrato" (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

3.4.1 Classificação dos Antioxidantes

Os antioxidantes podem ser classificados como antioxidantes primários que atrasam ou inibem a etapa de iniciação reagindo com um radical lipídico e bloqueiam a etapa de propagação reagindo com radicais peroxil ou alcoxil ou como antioxidantes secundários que são compostos que delongam a taxa de oxidação. Isso pode ser adquirido de várias maneiras, seja com a remoção do substrato ou com a extinção de oxigênio singlete (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

Da mesma forma, os antioxidantes podem ser classificados quanto a sua ação, sendo estes como sinergistas que são substâncias que podem aumentar a ação de antioxidantes primários quando utilizados em composição apropriada com eles, ou seja, por sinergia. Podem se classificar como compostos removedores de oxigênio que atuam sequestrando o oxigênio presente no meio através de reações químicas estáveis tornando-os indisponíveis para intervir como propagadores da autooxidação (BAILEY, 1996; RAMALHO; JORGE, 2006).

Segundo Bailey (1996), citado por Ramalho; Jorge (2006), também podem ser antioxidantes biológicos que removem oxigênio ou compostos altamente reativos de um sistema. Estas substâncias incluem várias enzimas, como glucose oxidase, superóxido dismutase e catalases. Os mesmos também citam os agentes quelantes/sequestrantes, estes complexam íons metálicos, especialmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação de lipídios.

E por fim, podem ser antioxidantes mistos, que incluem compostos vegetais e animais. Entre eles estão as proteínas hidrolisadas, flavonoides e derivados de ácido cinâmico (ácido caféico) possuindo alta atividade antioxidante em alimentos (BAILEY, 1996; RAMALHO; JORGE, 2006).

3.4.2 Origem dos antioxidantes

As substâncias antioxidantes podem ser de origem sintética ou natural. Os antioxidantes sintéticos são produzidos quimicamente e adicionados a produtos como conservantes para que eles possam prolongar a vida útil. Os antioxidantes sintéticos atualmente permitidos para uso em alimentos incluem butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA), propilgalato (PG), dodecylgalato (DG) e butilhidroquinona terciária (TBHQ) (KEBEDE; EMIRE, 2019).

O mecanismo de ação desses antioxidantes para prevenir o processo oxidativo é baseado no aprisionamento de radicais peroxila. Assim, o fenol doa um átomo de hidrogênio e termina a propagação de outras reações (BISBAL *et al.*, 2020).

Dentre os sintéticos, também existem também os tocoferóis, que possuem atividade antioxidante devido à capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres lipídicos, interrompendo a propagação em cadeia. Bem como, o ácido ascórbico, conhecido como vitamina C, que tem seu mecanismo antioxidante associado à remoção do oxigênio presente no meio de reações químicas estáveis, tornando-o indisponível para atuar como propagador da autooxidação (BERTOLIN *et al.*, 2011).

Os antioxidantes que têm causado problemas de saúde, em algumas pessoas, são os sintéticos. Os mais problemáticos são BHA, BHT e TBHQ e têm sido utilizados em produtos alimentícios, com algumas restrições, desde o final dos anos 1950 (KEBEDE; EMIRE, 2019). Alguns estudos demonstraram esses danos, sendo observados efeitos carcinogênicos, alterações hepáticas, elevada proliferação do retículo endoplasmático. Por estes motivos, o uso destes antioxidantes em alimentos é limitado (RAMALHO; JORGE, 2006; FREITAS *et al.*, 2012).

Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, estudos têm sido direcionados para a busca de produtos naturais com ação antioxidante que possam substituir os sintéticos ou fazer associações dentro deles, a fim de reduzir sua proporção em produtos farmacêuticos cosméticos e/ou alimentos (SOARES, 2002).

Assim como os antioxidantes naturais podem ser extraídos de vegetais e plantas, os mesmos possuem elevados níveis de compostos fenólicos, os quais têm demonstrado alto potencial antioxidante, podendo ser usados como conservantes naturais, entre os quais se destacam os flavonoides, carotenoides, tocoferóis e ácido ascórbico (SILVA *et al.*, 2022). Estes exibem grande quantidade de propriedades fisiológicas (como antialérgica, antiarteriogênica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotetiva e vasodilatadora), mas o principal efeito dos compostos fenólicos tem sido atribuído à sua ação antioxidante (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; ANDREO; JORGE, 2007).

3.5 Atividade antimicrobiana

Dentre as inúmeras atividades bioativas dos compostos fenólicos, destacam-se a antioxidante e conservante, onde a atividade conservante se faz necessária, devido à presença de água e ingredientes orgânicos, alguns produtos como alimentos, fármacos e cosméticos que são vulneráveis ao ataque microbiano, pois este altera a qualidade do produto, por isso, atualmente são utilizados conservantes como metil e propilparabeno (LIMA; COMARELLA, 2009), entretanto os mesmos são sintéticos

A contaminação microbiana dos produtos pode causar danos não apenas às formulações, mas também à saúde dos consumidores, desencadeando alterações nas propriedades químicas e físicas dos produtos relacionados, e arriscando a contaminação à saúde dos usuários. Pensando nisso, as indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia preocupam-se em garantir o controle de qualidade e segurança, e investem cada vez mais no desenvolvimento de novos métodos para minimizar a ocorrência de contaminação microbiana (MARTELLI *et al.*, 2021).

Agentes antibacterianos são definidos como substâncias usadas para preservar alimentos e prevenir o crescimento e deterioração de microrganismos, incluindo agentes antimofos e inibidores de leveduras e cordões bacterianos (PEREIRA, 2013).

O uso de muitos conservantes no setor alimentício e farmacêutico é limitado devido à sua toxicidade e potencial alergênico (PEREIRA, 2011). No entanto, atualmente existe uma busca notável por produtos que utilizem fontes naturais com o objetivo de reduzir ou até mesmo substituir os conservantes tradicionais.

A atividade inibitória do extrato de semente de uva contra uma variedade de microrganismos foi bem estabelecida. Sua atividade é atribuída à presença de polifenóis, um grupo de metabólitos secundários de plantas com diversas estruturas químicas e funções que são produzidos em resposta a várias formas de estresse fisiológico. As uvas são particularmente ricas em polifenóis bioativos, especialmente flavonoides, estilbenos e ácidos fenólicos. Dentre os diversos polifenóis da uva, os flavonoides são os mais estudados e conhecidos por apresentarem atividade antibacteriana devido a sua atividade no citoplasma celular, levando a *lise* e liberação de ATP intracelular (ANASTASIADI *et al.*, 2009; LEAL *et al.*, 2020).

Assim, para que estes compostos se tornem disponíveis os mesmos devem ser extraídos utilizando-se de uma metodologia adequada para a manutenção das propriedades bioativas dos compostos.

3.6 Extração assistida por ultrassom

Os métodos de extração podem ser divididos em convencionais e não convencionais, variando em função de custos e nível de complexidade. O processo convencional consiste na extração sólido-líquido utilizando solventes orgânicos, que apresentam várias desvantagens como: geração de resíduos tóxicos, transformação química dos extratos, utilização de solventes que podem ser prejudiciais, em longo prazo, ao meio ambiente, além disso, a resistência natural da estrutura da planta para a penetração do solvente faz a extração convencional ser inadequada (SILVA; GARCIA; FRANCISCATO, 2016)

Técnicas não convencionais podem ser mais eficazes ajudando a reduzir o tempo do processo e requerendo menores volumes de solventes, destacando-se a extração assistida por ultrassom.

Os extratos vegetais são preparações obtidas pela concentração, até determinado grau, das soluções resultantes do esgotamento das substâncias por um dissolvente como água, álcool, éter, acetona, metanol, entre outros (PRISTA *et al.*, 2008).

O processo de extração começa quando o solvente é transferido da fase líquida para a fase sólida, penetrando no interior das partículas sólidas por mecanismos de difusão molecular, assim, os elementos solúveis são dissolvidos por desorção da matriz vegetal e solvatação no solvente. A partir deste momento, o soluto desejado presente na solução é transportado para a superfície da partícula sólida por difusão molecular, e a solução é conduzida da superfície sólida para o interior do fluido por um mecanismo de convecção (ROSTAGNO; PRADO, 2013).

Relacionado a uma ou mais propriedades importantes, segundo Sarker; Latif; Gray (2005), citados por Santos (2018), o processo de extração busca alta seletividade/pureza, onde o extrato resultante possui poucos compostos interferentes ou coextraídos indesejados. Os métodos de extração podem ser divididos em convencionais e não convencionais, variando em função de custos e nível de complexidade (SILVA; GARCIA; FRANCISCATO, 2016).

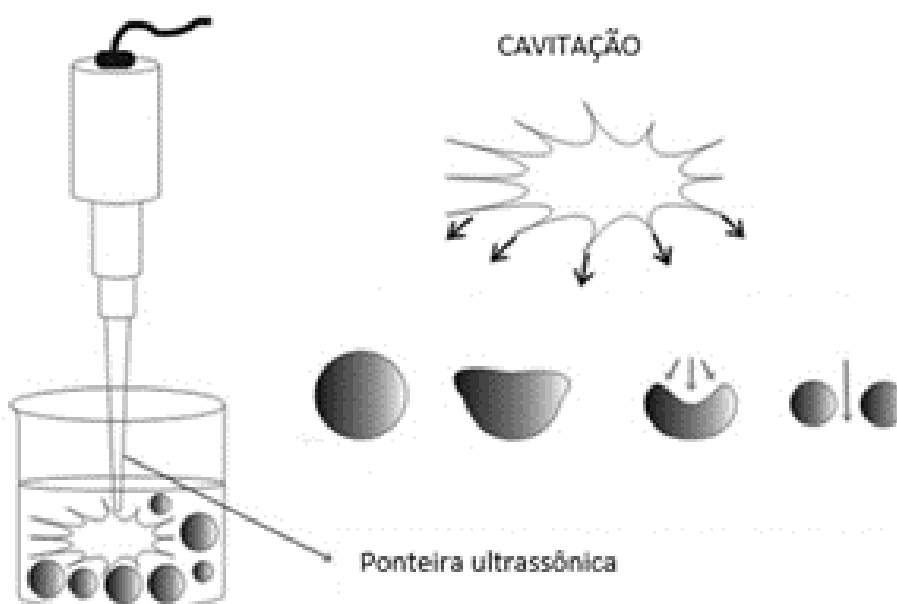
O ultrassom é constituído por um conjunto de ondas sonoras de alta frequência que carregam vibrações mecânicas. Essa tecnologia explora fenômenos físicos e químicos distintos em relação às técnicas tradicionais. Além de reduzir a dependência de produtos químicos ou calor no processo, ela oferece benefícios em termos de produtividade, rendimento e precisão. Essa abordagem tem sido alvo de pesquisas e aplicações industriais em processos como emulsificação, homogeneização, esterilização, filtração, secagem, separação e extração de compostos (BERNARDO; ASCHERI; CARVALHO, 2016).

O ultrassom é uma onda mecânica que se propaga em meios sólidos, líquidos e gasosos, que produz um fenômeno chamado cavitação. A cavitação forma microbolhas causadas pela formação de cavidades pelas quais os gases dissolvidos migram no sistema. Estes então aumentam e diminuem de tamanho criando ciclos de expansão e compressão até a bolha implodir, liberando muito calor e aplicando alta pressão (BENDICHO *et al.*, 2012).

Devido à turbulência resultante, a presença de material sólido no sistema leva à implosão assimétrica das microbolhas, o que faz com que o jato colida com a superfície sólida e provoca a circulação do líquido. Reatores micrométricos são formados a partir dessas bolhas, que podem quebrar ligações que geram microjatos de alta velocidade. O calor liberado pela implosão aumenta a solubilidade do analito, aumentando assim a eficiência da extração (BENDICHO *et al.*, 2012).

Portanto, a quebra da membrana celular das matérias-primas é promovida pela força de cisalhamento, criada pela alta velocidade, dispersão de ondas ultrassônicas durante o ciclo de alta e baixa pressão, liberando, assim, substâncias de interesse, como os fenólicos (Figura 8).

Figura 8 - Diagrama demonstrando a cavitação de bolhas através do uso da ponteira ultrassônica



Fonte: Adaptado de CHEABURU-YILMAZ; KARASULU; YILMAZ (2019)

O banho e a sonda são, habitualmente, os dois tipos de aparelhos geradores de ondas ultrassônicas. O banho ultrassônico, possui preso ao fundo da cuba, um transdutor, que transmite através de um líquido, normalmente água, a energia ultrassônica, onde o processo de cavitação ocorre (SCHNEIDER, 2005). A principal desvantagem dos banhos, apesar de serem mais os utilizados, é devido ao mesmo possuir dispersão da energia ultrassônica e menor influência nos sistemas reacionais. Nas sondas ultrassônicas o transdutor encontra-se fixado em sua extremidade, fazendo com que a energia na região do meio, que contém a amostra, promova uma cavitação mais eficiente no líquido (LUQUE-GARCÍA; LUQUE DE CASTRO, 2003).

As taxas de extração do ultrassom e a cavitação sonora podem sofrer influência devido a características como frequência, amplitude, comprimento de onda. Além disso, a eficiência da técnica de extração por ultrassom pode ser influenciada por várias variáveis como tempo de extração, tipo e concentração do solvente, razão solvente/sólido, pH, temperatura, dentre outras (TEIXEIRA, 2018).

Devido a isso, e para obter um sistema de extração com mais rentabilidade e lucratividade, deve-se identificar as variáveis envolvidas previamente ao processo de otimização, podendo-se utilizar menor tempo, consumo de energia e solvente, sendo de suma importância para maximizar as respostas (DAI; MUMPER, 2010). A

otimização se dá por meio do monitoramento e medida da influência de cada variável, ou fator, por vez em uma resposta experimental e trata-se de um aperfeiçoamento do desempenho de um sistema, processo ou produto, com a finalidade de conseguir maior proveito e melhor resposta possível (BEZERRA *et al.*, 2008).

Assim, através do uso de parâmetros adequados obtém-se o extrato apropriado que pode ser utilizado para diversos fins, sendo os mesmos naturais e seguros.

3.7 Aplicação de extratos naturais na alimentação vegana

Para tanto, a busca por uma vida mais natural e pela utilização de produtos de fontes naturais tem feito com que as pessoas venham aderindo à dieta vegetariana e além destes, outros motivos influenciam essa decisão. Como por exemplo, motivação religiosa, anatômica e fisiológica, espiritual, ética e econômica (VERDE *et al.*, 2014).

O veganismo se encaixa em um tipo de política de vida, a qual está voltada para as formas atuais de preocupações com o corpo, com a saúde e com os posicionamentos éticos. De outro modo, esta política é uma forma de ação que alarga o sentido para as questões estéticas, filosóficas e morais (TRIGUEIRO, 2013).

O alto consumo de alimentos à base de plantas, como frutas, verduras, nozes e grãos, está associado aos benefícios metabólicos que esses alimentos trazem ao corpo humano, como baixo risco de doenças cardiovasculares e diminuição de casos de obesidade e de diabetes tipo 2 (SARAIVA, 2021).

Os efeitos de proteção desses alimentos são causados, principalmente, pela redução da ingestão de gordura e de vários nutrientes contidos neles, incluindo ácidos graxos mono e poli-insaturados, vitaminas, antioxidantes, minerais, fitoquímicos, fibras e proteínas vegetais (SARAIVA, 2021).

Como sabido, os produtos veganos são aqueles que não são produzidos utilizando fontes animais ou que tenha algum tipo de exploração animal ou que sejam testados em animais. Os indivíduos veganos possuem dietas variadas, e com algumas restrições que favorecem a falta de alguns nutrientes nas suas dietas, o que, normalmente, leva a prescrição de planos alimentares e a criação de produtos industrializados que apresentem alternativas práticas a este público, procurando oferecer produtos que agreguem nutrientes (NEVES, 2018) e que façam com que os mesmos consumam formas alimentícias nutricionais variadas.

Do ponto de vista sustentável e econômico, busca-se a necessidade de desenvolver formulações, utilizando substitutos proteicos aliados a adjuvantes alimentícios que forneçam atributos desejáveis ao produto. Além disso, é necessário realizar estudos relacionados a vida útil do produto avaliando a vantagem do emprego de determinados aditivos, corroborando a necessidade de estudos de viabilidade relacionado ao armazenamento e adoção da melhor embalagem (FREITAS *et al.*, 2021).

3.8 Estudo de estabilidade

A vida útil de um produto pode ser reduzida pelos efeitos da umidade, temperatura, armazenamento e até mesmo microrganismos que tornam o produto impróprio para consumo. Estes fatores promovem alterações sensoriais, no valor nutricional e composição.

Segundo o Guia n. 16, versão 1, de 5 de outubro de 2018 da Anvisa, existem vários tipos de estudos de estabilidade e o fabricante deve selecionar o(s) mais adequado(s) aos resultados exigidos.

Para Grizotto *et al.* (2006), os testes acelerados de estabilidade são usados para determinar a vida útil de um produto em um curto período de tempo, utilizando fatores de aceleração, como a temperatura. Portanto, este processo ocorre de forma mais rápida quando comparado a resultados de um estudo realizado com métodos tradicionais (CELESTINO, 2019).

São os tipos de estudo, o estudo de estresse, que determina a susceptibilidade à degradação de um ingrediente ou combinação de ingredientes, os estudos acelerados, onde as condições de armazenamento são intensificadas para acelerar a taxa de qualquer mudança e para reduzir o tempo de estudo. Existe o estudo de longa duração, onde o tempo de armazenamento é igual ou maior à validade prevista, também se tem o estudo de acompanhamento, o qual é realizado após o início da comercialização do alimento, com o objetivo de monitorar e confirmar o prazo de validade previamente estabelecido. Já o estudo de uso, é usado para simular a estabilidade do produto após a abertura e durante o uso pelo consumidor, além do estudo de transporte, que é usado para simular as condições de transporte e armazenamento durante a distribuição do produto, bem como, podem ser realizados testes de desafio microbiológico (BRASIL, 2018).

Os alimentos vendidos no Brasil devem atender aos requisitos estabelecidos em Lei e nos regulamentos técnicos editados pela Anvisa ou por outros agentes públicos reguladores. Portanto, a aplicação do estudo de estabilidade é de suma importância visto os critérios de segurança que devem ser atendidos para comercialização.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostragem

Para a realização da pesquisa foi utilizado o bagaço da variedade de uva Bordô, da espécie *Vitis labrusca*, cultivada e colhida no oeste do Paraná, safra 2020/2021. As amostras do bagaço da uva, após vinificação, foram, cuidadosamente, coletadas e armazenadas sob refrigeração de -20 °C. Em seguida, foi realizada a liofilização utilizando-se o Liofilizador - L101 Liotop® e após retornaram para refrigeração a -20 °C, até serem moídas.

O processo de moagem das amostras foi realizado em moinho de facas SL-30 Solab Científica®, e posteriormente foram passadas em tamis malha 425 µm (35 mesh), para uniformização granulométrica, e para assim, dar seguimento com a extração.

4.2 Otimização da extração por ultrassom

4.2.1 Otimização da extração

Para a extração foi utilizado Sonicador de Ponteira Ultrassônico gabinete acústico 550 Watts Eco-Sonics0® disponível no Laboratório Multiusuário Central Analítica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Toledo/PR.

Para a otimização da extração dos compostos bioativos foi realizado um delineamento experimental 2⁴ com quadruplicata no ponto central. Os fatores avaliados foram a relação água:etanol (100:0 a 30:70), a concentração de ácido cítrico adicionado à solução (0 a 4 %), a potência de ultrassom (1000 a 4500 Watts por litro – W L⁻¹) e a razão de massa (1 a 15 %), totalizando 28 ensaios (Tabela 1). Foram mantidos fixos a temperatura de extração em 25 °C, o tempo de extração de 5 minutos e a quantidade de solvente de 100 mL.

Tabela 1 - Testes obtidos com o planejamento experimental variáveis não codificadas

| Teste | Etanol (%) | Ácido cítrico (%) | Potência (W L ⁻¹) | Massa de bagaço de uva (%) |
|-------|------------|-------------------|-------------------------------|----------------------------|
| 1 | 35,0 | 2,0 | 4500,0 | 8,0 |
| 2 | 35,0 | 2,0 | 2750,0 | 8,0 |
| 3 | 56,8 | 3,2 | 3838,9 | 3,6 |
| 4 | 13,2 | 0,8 | 1661,1 | 3,6 |
| 5 | 70,0 | 2,0 | 2750,0 | 8,0 |
| 6 | 0,0 | 2,0 | 2750,0 | 8,0 |
| 7 | 13,2 | 3,2 | 3838,9 | 3,6 |
| 8 | 13,2 | 3,2 | 1661,1 | 12,4 |
| 9 | 35,0 | 2,0 | 2750,0 | 8,0 |
| 10 | 35,0 | 2,0 | 2750,0 | 8,0 |
| 11 | 35,0 | 2,0 | 2750,0 | 1,0 |
| 12 | 35,0 | 4,0 | 2750,0 | 8,0 |
| 13 | 13,2 | 3,2 | 3838,9 | 12,4 |
| 14 | 35,0 | 2,0 | 2750,0 | 8,0 |
| 15 | 56,8 | 0,8 | 3838,9 | 3,6 |
| 16 | 56,8 | 0,8 | 1661,1 | 3,6 |
| 17 | 35,0 | 0,0 | 2750,0 | 8,0 |
| 18 | 13,2 | 0,8 | 3838,9 | 12,4 |
| 19 | 56,8 | 3,2 | 1661,1 | 12,4 |
| 20 | 13,2 | 0,8 | 1661,1 | 12,4 |
| 21 | 35,0 | 2,0 | 1000,0 | 8,0 |
| 22 | 56,8 | 3,2 | 1661,1 | 3,6 |
| 23 | 35,0 | 2,0 | 2750,0 | 15,0 |
| 24 | 13,2 | 3,2 | 1661,1 | 3,6 |
| 25 | 56,8 | 0,8 | 1661,1 | 12,4 |
| 26 | 13,2 | 0,8 | 3838,9 | 3,6 |
| 27 | 56,8 | 3,2 | 3838,9 | 12,4 |
| 28 | 56,8 | 0,8 | 3838,9 | 12,4 |

Fonte: Autor (2023)

Após, os extratos obtidos foram filtrados e armazenados em frascos de vidro âmbar vedados sob refrigeração de -20 °C até o momento das análises. As respostas avaliadas foram o teor de compostos fenólicos totais e de antocianinas monoméricas.

4.2.2 Preparo do extrato otimizado

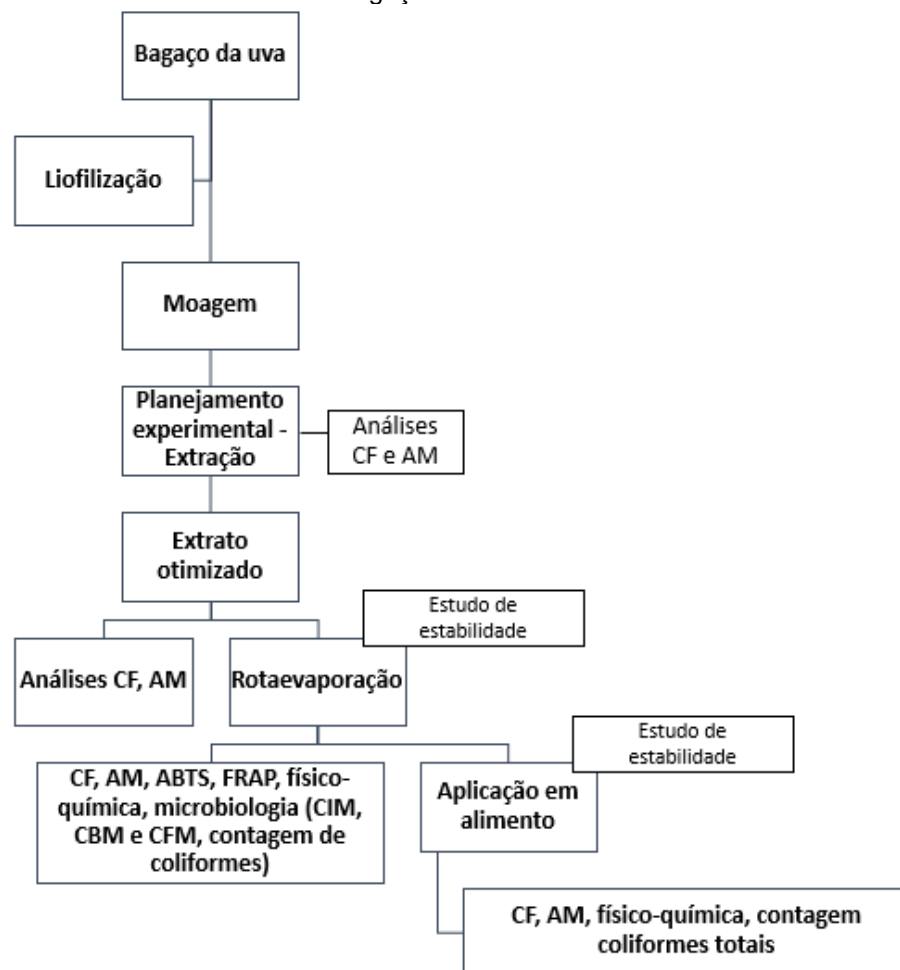
Após a obtenção do ponto ideal de extração foi preparado um novo extrato, denominado de extrato otimizado líquido, preparado na condição ideal do delineamento experimental e submetido a determinação do teor de compostos fenólicos e antocianinas monoméricas e atividade antioxidante.

Após o extrato otimizado líquido foi concentrado por rotaevaporação a 30 °C até aproximadamente 30 % do volume inicial do extrato, utilizando-se Evaporador

Rotativo SL-126 Solab Científica® e foi obtido o extrato líquido concentrado, onde em seguida, foram realizadas análises de teor de compostos fenólicos e antocianinas monoméricas, atividade antioxidante e microbiológica, análises físico-químicas e o estudo de estabilidade acelerada do extrato e da aplicação em um produto alimentício.

O preparo dos extratos pode ser melhor visualizado através do esquema apresentado na Figura 9.

Figura 9 - Fluxograma da sequência de preparos e experimentos realizados para os extratos do bagaço de uva Bordô



Legenda: CF: Compostos fenólicos; AM: Antocianinas monoméricas; ABTS: método de captura do radical livre ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico); FRAP: Poder de capacidade de redução férrica. CIM: Concentração inibitória mínima; CBM: Concentração bactericida mínima; CFM: Concentração fúngica mínima.

Fonte: Autor (2023)

Foi realizado um controle negativo (placebo) da condição otimizada obtida no delineamento experimental, contendo etanol 70 % acidificado com ácido cítrico na concentração de 3,2 %, submetido as condições determinadas como ideais para o extrato otimizado, bem como, as análises do extrato otimizado do bagaço de uva.

4.3 Estudo de estabilidade acelerado

4.3.1 Estudo de estabilidade acelerado do extrato líquido concentrado

O extrato líquido concentrado obtido, foi armazenado em recipientes de vidro âmbar fechados para evitar a ação direta da luz, sob temperatura de 35 °C por 35 dias. Onde nos tempos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias foram realizadas as análises de estabilidade sendo análises físico-químicas, atividade antioxidante e capacidade conservante.

4.3.2 Aplicação e estabilidade do extrato líquido concentrado em um produto alimentício

4.3.2.1 Elaboração do produto alimentício tipo iogurte

Para a aplicação do extrato líquido concentrado em um produto alimentício, seguido do estudo de estabilidade, foi elaborado produto alimentício tipo iogurte com características veganas, com uma formulação padrão (fórmula base). O produto alimentício foi acrescido, separadamente, do componente conservante estudado e do controle negativo, sendo eles, respectivamente, o extrato líquido concentrado de bagaço de uva e o ácido cítrico submetido as mesmas condições do extrato. A Tabela 2 demonstra as quantidades de cada ingrediente utilizados em cada uma das duas formulações.

Tabela 2 - Composição do iogurte vegano.

| Composição | iogurte com ácido cítrico (controle negativo) (C-) | iogurte com extrato de bagaço de uva líquido concentrado (E) |
|------------------------------------|---|---|
| Leite de amêndoas | 100 mL | 100 mL |
| Tapioca | 5 g | 5 g |
| Açúcar demerara | 5 g | 5 g |
| Aroma de tutti-frutti | 1 mL | 1 mL |
| Ácido cítrico | 2 g | - |
| Extrato do bagaço de uva otimizado | - | 2 g |

Fonte: Autor (2023)

Para o preparo do produto alimentício, tipo iogurte, foram adicionados ao liquidificador Britânia® B1000 2L Branco - 12 Velocidades 1000 W, o leite de amêndoas, a tapioca e o açúcar demerara, homogeneizados por 5 min na potência 3. Após a mistura foi agitada sob aquecimento de 50 °C, utilizando-se uma chapa de aquecimento, até obtenção da consistência ideal. Em seguida, foi adicionado o aroma

de tutti-fruti e dividiu-se o iogurte em duas partes iguais. Na primeira parte foi adicionado o ácido cítrico como controle negativo (C-) e na segunda parte foi adicionado o extrato de bagaço líquido concentrado (E). Em seguida foi realizado um estudo de estabilidade submetendo as duas formulações às condições de armazenamento de 4 °C e de 35 °C por 35 dias, os produtos foram armazenados em frasco de vidro âmbar. Os preparos e o estudo foram realizados no Laboratório Multiusuário Central Analítica da UTFPR - Toledo.

O iogurte vegano foi caracterizado físico-quimicamente, determinado a atividade antioxidante e a capacidade conservante por 35 dias nas temperaturas de armazenamento de 4 °C e 35 °C, conforme o realizado para o estudo de estabilidade do extrato líquido concentrado.

4.4 Métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante

4.4.1 Compostos fenólicos totais

O conteúdo total de compostos fenólicos (CF) foi determinado em triplicata, de acordo com Singleton & Rossi (1965), com algumas modificações feitas por Boroski *et al.* (2015), usando o reagente Folin-Ciocalteu.

A absorbância foi medida a 725 nm em espectrofotômetro UV-VIS T-80+ PG Instruments®, usando etanol como branco, e as amostras foram diluídas até a absorbância ficar entre 0,2 e 1,0. O teor total de compostos fenólicos foi determinado usando a curva de calibração para ácido gálico e expresso como mg equivalente de ácido gálico por grama (EAG g⁻¹). Para tanto, por meio da equação de regressão linear, os resultados da concentração de CF presentes nas amostras foram obtidos pela extrapolação da curva, sendo expressos em mg de equivalente de ácido gálico por litro de extrato (mg EAG L⁻¹). Para as amostras do delineamento experimental, considerou-se a massa inicial de resíduo utilizado para o preparo do extrato, para expressar o resultado em mg de equivalente de ácido gálico por grama (mg EAG g⁻¹ de amostra) de amostra de bagaço de uva liofilizado. Para o extrato otimizado concentrado o resultado foi expresso em mg de equivalente de ácido gálico por litro (mg EAG L⁻¹) de extrato. Para o produto alimentício tipo iogurte o resultado foi expresso em mg de equivalente de ácido gálico por 100 mililitros (mg EAG 100 mL⁻¹ iogurte) de iogurte.

4.4.2 Análise de antocianinas monoméricas por pH diferencial

A determinação do teor de antocianinas monoméricas (AM) das amostras foi realizada pela metodologia de pH diferencial conforme Giusti e Wrolstad (2001), com modificações.

Primeiramente, diluiu-se as amostras em balão volumétrico utilizando-se o tampão pH 1,0 cloreto de potássio 0,025 mol L⁻¹ onde considerou-se a diluição de no máximo uma parte de amostra para quatro partes de tampão (1:4).

O fator de diluição apropriado foi considerado quando a absorbância com o tampão pH 1,0 cloreto de potássio 0,025 mol L⁻¹ lida em 520 nm, ficou entre 0,2 e 1,0, a qual corresponde a faixa de linearidade do espectrofotômetro. A partir deste fator de diluição, preparou-se duas diluições para cada amostra, uma com o tampão pH 1,0 cloreto de potássio 0,025 mol L⁻¹ e outra com o tampão pH 4,5 acetato de sódio 0,4 mol L⁻¹ protegendo-se da luz.

A absorbância da amostra, já diluída nos tampões, foi determinada em 520 e 700 nm, em espectrofotômetro UV-VIS T-80+ PG Instruments®. Para o branco foi utilizada água destilada.

O valor de absorbância final foi calculado a partir da Equação 1, sendo que a leitura de 700 nm foi realizada para se descontar a turbidez da amostra.

$$A = (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH \ 1,0} - (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH \ 4,5} \quad (1)$$

O cálculo da concentração total das antocianinas monoméricas, expressos em malvidina-3-glucosídeo equivalente, foi calculado usando a Equação 2:

$$\text{Malvidina - 3 - glucosídeo equivalente, } \frac{mg}{L} = \frac{A * PM * DF * 10^3}{\epsilon * 1} \quad (2)$$

Na qual:

$$A = (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH \ 1,0} - (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH \ 4,5}$$

1,0 = caminho ótico percorrido (cubeta do espectrofotômetro)

10³ = fator de conversão de g para mg

DF = fator de diluição estabelecido

Para conteúdo de malvidina-3-glucosídeo:

ϵ (coeficiente molar) = 28000

PM (peso molecular) = $493,2 \text{ g mol}^{-1}$

Para o extrato obtido no delineamento experimental, os resultados foram expressos em mg equivalente malvidina-3-glucosídeo por grama de amostra de bagaço de uva liofilizado ($\text{mg eq mlv-3-O-gld g}^{-1}$ de amostra). Para o extrato otimizado concentrado o resultado foi expresso em mg de equivalente de malvidina-3-glucosídeo por litro de extrato ($\text{mg eq mlv-3-O-gld L}^{-1}$ de extrato). Para o produto alimentício tipo iogurte o resultado foi expresso em mg de equivalente de malvidina-3-glucosídeo por 100 mililitros de iogurte ($\text{mg eq mlv-3-O-gld 100 mL}^{-1}$ iogurte)

4.4.3 Captura do radical livre ABTS

A capacidade antioxidante foi medida pelo método ABTS ([ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)]), determinada em triplicata de acordo com Re *et al.* (1999), e modificações segundo Boroski *et al.* (2015). As amostras foram diluídas perfazendo a absorvância entre 0,2 e 1,0, sendo o Trolox (0 a $2000 \mu\text{mol L}^{-1}$) usado para construir a curva padrão. A absorvância foi medida em espectrofotômetro UV-VIS T-80+ PG Instruments® a 734 nm, usando etanol como branco.

Para cada absorvância obtida no extrato otimizado, calculou-se a concentração do extrato em equivalente Trolox (ET). Em seguida dividiu-se o valor obtido pela concentração do extrato (g L^{-1}) para obter μmol de equivalente Trolox (ET) por grama de extrato ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$ de extrato), após dividiu-se pela massa inicial utilizada para se obter μmol de equivalente Trolox (ET) por grama de amostra de bagaço de uva liofilizado ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$ de amostra). Para o extrato otimizado concentrado o resultado foi expresso μmol de equivalente Trolox (ET) por litro de extrato ($\mu\text{mol ET L}^{-1}$ de extrato).

4.4.4 Poder de capacidade de redução férrica (FRAP)

A análise do poder de redução usando o poder de capacidade de redução férrica (FRAP) foi realizada em triplicata de acordo com Benzie; Strain (1996), seguindo algumas modificações em concordância com Boroski *et al.* (2015).

As amostras foram preparadas em água destilada, sob proteção da luz, a uma concentração de 1 mg mL^{-1} . Em seguida, com 3 mL do reagente FRAP, a solução da amostra resultante foi homogeneizada e incubada em banho de aquecimento por 40 minutos a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A absorvância lida em espectrofotômetro UV-VIS T-80+ PG Instruments® a 593 nm, usando água destilada como branco.

Construiu-se uma curva de calibração da absorbância média versus concentração de padrão sulfato ferroso ($\mu\text{mol L}^{-1}$) para se obter a equação da reta, sendo a concentração de padrão de sulfato ferroso dada em 0, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Para cada absorbância obtida do extrato otimizado, calculou-se a concentração de extrato em equivalente sulfato ferroso (Eq Fe (II)). Em seguida dividiu-se o valor obtido pela concentração do extrato (g L^{-1}) para obter $\mu\text{mol Eq Fe (II)}$ por grama de extrato. Em seguida dividiu-se pela massa inicial para se obter μmol de equivalente Sulfato ferroso (Eq Fe (II)) por grama de amostra de bagaço de uva liofilizado ($\mu\text{mol Eq Fe (II) g}^{-1}$ de amostra).

4.5 Métodos para determinação da atividade antimicrobiana

4.5.1 Microrganismos e cultura

As propriedades antibacterianas foram testadas contra bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778) e gram-negativas *Salmonella enterica* (ATCC 06539) e *Escherichia coli* (ATCC 10536). Em relação as propriedades antifúngicas foram utilizadas as leveduras *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Foram usados como controle positivo bacteriano Ampicilina 1 mg mL^{-1} e como controle positivo fúngico Nistatina 1 mg mL^{-1} .

4.5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A atividade antibacteriana dos extratos foi determinada em triplicata pelo método de microdiluição em caldo proposto pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* no documento M07-A9 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012).

Foram utilizadas placas com 96 poços, onde foram adicionados 100 μL de caldo Mueller-Hinton (MHB) para bactérias e Sabouraud Dextrose (SDB) para leveduras, e na primeira linha foram adicionados 100 μL de extrato concentrado, que foi previamente diluído e solubilizado na concentração de 40 % utilizando-se MHB. Em seguida realizou-se a diluição seriada, utilizando-se a última linha como o controle do crescimento bacteriano. Em cada poço foram colocados 10 μL de cada cultura bacteriana, padronizada em salina com a escala 0,5 de Mc Farland e diluída 1:20 em caldo MHB ou SDB. A CIM foi definida como a maior diluição que foi capaz de inibir o crescimento microbiano.

Foi realizado o teste com o controle negativo, ou seja, solução preparada nas mesmas condições do extrato, porém sem o bagaço de uva. Esta solução foi preparada na concentração de 20 % e testada da mesma forma que o extrato.

4.5.3 Determinação da concentração bactericida e fúngica mínima (CBM e CFM)

Para determinar CBM ou CFM, uma subcultura usando ágar Mueller-Hinton (MHA) ou Sabouraud Dextrose (SDA) foi feita usando o conteúdo dos poços no teste de CIM em que nenhum crescimento bacteriano ou fúngico foi visto. As placas foram incubadas em uma estufa a 37 °C por 24 horas. A CBM ou CFM é definida como a menor concentração que causa morte em 99,9% ou mais do inóculo microbiano utilizado. Os testes foram realizados em triplicata (AMADO *et al.*, 2019).

4.5.4 Determinação da presença de coliformes totais e termotolerantes

A contagem de coliformes totais foi realizada conforme metodologia descrita por Silva (2017), onde inicialmente realizou-se a diluição da amostra em água peptonada (1:10) e procedeu-se com a diluição seriada (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}).

Em seguida, retirou-se uma alíquota de 1 mL de cada diluição e a mesma foi adicionada em 9 mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) com tubos de Durham. Incubou-se as amostras a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 - 48 ± 2 h. Após as primeiras 24h foram avaliados o crescimento e a produção de gás e caso não ocorresse, retornavam para a estufa por mais 24 h (SILVA, 2017).

Para contagem de coliformes totais, a partir dos tubos de LST com crescimento e produção de gás, transferiu-se uma alçada carregada para tubos com Caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB). Incubou-se os tubos de VB a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 h. Após as primeiras 24h foram avaliados o crescimento com a produção de gás e caso não ocorresse, retornavam para a estufa por mais 24 h e repetindo-se a leitura (SILVA, 2017).

Para contagem de coliformes termotolerantes, a partir dos tubos de LST com crescimento e produção de gás, transferiu-se uma alçada carregada para tubos com Caldo *Escherichia Coli* (EC). Incubou-se os tubos de EC em banho-maria $45,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 h, avaliando-se o crescimento com a produção de gás. A incubação foi acompanhada de um tubo inoculado com a cepa padrão positiva (*E. coli*) e um tubo com a cepa padrão negativa (*Enterobacter aerogenes*) (SILVA, 2017).

Os resultados foram expressos em Número Mais Provável (NMP) g^{-1} usando-se as tabelas de NMP.

4.6 Métodos para determinação das características físico-químicas

Foram utilizadas para determinação das características físico-química, os métodos de análises de perda por dessecação (umidade) por secagem direta em estufa a 105 °C, onde foi levada a cápsula de porcelana por 1 hora a 105 °C, resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e pesada a cápsula anotando-se o peso. Em seguida, pesou-se 5 g da amostra em cápsula de porcelana e foi anotado o peso. Aqueceu-se durante 3 horas e foi resfriado em dessecador até a temperatura ambiente, pesou-se e anotou-se o peso. Repetiu-se a operação de aquecimento e resfriamento até peso constante (peso final) e aplicou-se os seguintes cálculos, conforme equação 3 (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

$$\frac{100*N}{P} = \text{umidade a } 105 \text{ }^{\circ}\text{C por cento m/m} \quad (3)$$

Onde:

N = n° de gramas de umidade (perda de massa em g; peso inicial – peso final)

P = n° de gramas da amostra

Em relação a determinação de cinzas, a cápsula de porcelana foi seca por 1 hora a 550 °C, resfriada em dessecador até a temperatura ambiente, pesada a cápsula de porcelana e anotado o peso. Após pesou-se 5 g da amostra na cápsula de porcelana e foi carbonizada a amostra na chama de bico de Bunsen até cessar o desprendimento de fumaça. Colocou-se o cadinho de porcelana no forno mufla, foi aquecido durante 4 a 6 horas e resfriado em dessecador até a temperatura ambiente e pesado. Repetiu-se as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante. O cálculo de determinação, foi realizado conforme a equação 3 (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

No estudo de estabilidade, também, foram realizadas análises organolépticas de cor, odor e aparência visual do extrato ao longo do período e, determinação do teor de sólidos solúveis, com auxílio de um refratômetro manual (Megabrix®), onde foram utilizados 100 uL de amostra de iogurte pura, em triplicata, determinados conforme escala °Brix. Para o extrato líquido concentrado foi utilizada a diluição de 0,1 g em 1 mL de água destilada, em triplicata.

Para a realização da análise de condutividade, utilizou-se um Medidor de Condutividade de Bancada MS Tecnocon mCA-150, previamente calibrado com

solução padrão de calibração ($146,9 \mu\text{S cm}^{-1} \pm 0,5 \%$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$), onde as amostras de iogurte foram diluídas 1 g de amostra em 20 mL de água destilada e para o extrato líquido concentrado, foi realizada a diluição de 0,1 mL em 10 mL, em triplicata. Para as medidas de pH foi utilizado um Medidor de pH de Bancada MS Tecnopon mPA-210, previamente calibrado com tampões 4,0 e 7,0, as diluições seguiram como na análise de condutividade.

Para a determinação da acidez total foi utilizado o método de titulação (Instituto Adolfo Lutz, 1985), onde pesou-se 1,00 g da amostra em erlenmeyer, diluiu-se o mesmo em 20 mL de água destilada e adicionou-se 0,30 mL de fenoftaleína para cada 100 mL da solução a ser titulada. A solução titulante foi a solução de hidróxido de sódio (NaOH) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, que foi titulada sob agitação constante, até coloração rósea persistente por 30 segundos, a solução titulante foi previamente padronizada com hidrogenoftalato de potássio ($[\text{C}_6\text{O}_4(\text{COOH})(\text{COOK})]$). As análises foram realizadas em triplicata e o resultado foi expresso conforme a equação 4 (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

$$\frac{V*f*M*100}{P} = \text{acidez em mL de solução } M \% V/m \text{ ou } V/V \quad (4)$$

Onde:

V = nº de mL da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio

P = massa da amostra em g

M = molaridade da solução de hidróxido de sódio

4.7 Estudo de estabilidade de resveratrol determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC/CLAE)

A determinação de resveratrol nas amostras de extrato concentrado líquido do bagaço da uva foi realizada empregando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (UHPLC) Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific), equipado com detector UV-VIS (VWD-3400RS), bomba quaternária (LPG-3400SD), forno (TCC-3400RS) e sistema de injeção manual (20 μL), instalado na Central Analítica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, em Toledo - PR. A detecção de resveratrol foi realizada a 306 nm, com monitoramento em 220, 286, 306 e 320 nm.

As condições cromatográficas utilizadas foram coluna C18, ZORBAX Eclipse XDB (250 mm × 4,6 mm, 5 µm), onde a Coluna foi mantida a 25 ± 1 °C.

Para a fase móvel foi utilizada uma mistura de água ultrapurificada acidificada com ácido fosfórico (0,1%, v/v) e acetonitrila com um fluxo de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. As condições de tempo e o gradiente da fase móvel podem ser observadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições cromatográficas utilizadas para determinação da presença do composto resveratrol na amostra de extrato líquido concentrado do bagaço da uva submetido ao estudo de estabilidade com armazenamento de 35 dias sob temperatura de 35 °C.

| Tempo (min) | % água ultrapurificada acidificada com ácido fosfórico (0,1%, v/v) | % acetonitrila |
|--------------------|---|-----------------------|
| 0 | 75 | 25 |
| 12 | 75 | 25 |
| 13 | 5 | 95 |
| 20 | 5 | 95 |
| 21 | 75 | 25 |
| 30 | 75 | 25 |

Fonte: Autor (2023)

4.8 Análise estatística

O teste de falta de ajuste, o teste F, a ANOVA, a determinação dos coeficientes de regressão, a obtenção das superfícies de resposta e equação de desejabilidade foram realizados com o auxílio do software Design Expert 13 (StatEase, Tulsa, USA).

Os desvios-padrão, coeficientes de variação, equações da reta, teste T e p-valor foram calculados com auxílio do programa Excel® 2010.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização da extração por ultrassom

Os resultados obtidos nos 28 experimentos do planejamento experimental estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados para antocianinas e compostos fenólicos totais dos extratos obtidos do resíduo de bagaço de uva nas diferentes condições do planejamento experimental.

| Teste | % Etanol | % cítrico | Ácido | Potência (W L ⁻¹) | % Massa de resíduo | Antocianinas (mg g ⁻¹ de amostra) | Compostos fenólicos (mg g ⁻¹ de amostra) |
|-------|----------|-----------|-------|-------------------------------|--------------------|--|---|
| 1 | 35,0 | 2,0 | | 4500,0 | 8,0 | 11,89 ± 0,07 | 30,27 ± 0,78 |
| 2 | 35,0 | 2,0 | | 2750,0 | 8,0 | 15,80 ± 0,06 | 28,97 ± 0,92 |
| 3 | 56,8 | 3,2 | | 3838,9 | 3,6 | 20,59 ± 0,03 | 44,66 ± 1,64 |
| 4 | 13,2 | 0,8 | | 1661,1 | 3,6 | 11,81 ± 0,02 | 26,28 ± 1,25 |
| 5 | 70,0 | 2,0 | | 2750,0 | 8,0 | 15,18 ± 0,09 | 30,27 ± 0,82 |
| 6 | 0,0 | 2,0 | | 2750,0 | 8,0 | 7,28 ± 0,02 | 10,43 ± 0,89 |
| 7 | 13,2 | 3,2 | | 3838,9 | 3,6 | 10,21 ± 0,02 | 39,55 ± 8,66 |
| 8 | 13,2 | 3,2 | | 1661,1 | 12,4 | 7,67 ± 0,01 | 13,79 ± 0,52 |
| 9 | 35,0 | 2,0 | | 2750,0 | 8,0 | 14,73 ± 0,04 | 28,82 ± 3,73 |
| 10 | 35,0 | 2,0 | | 2750,0 | 8,0 | 14,22 ± 0,04 | 25,99 ± 0,48 |
| 11 | 35,0 | 2,0 | | 2750,0 | 1,0 | 16,76 ± 0,02 | 64,27 ± 1,25 |
| 12 | 35,0 | 4,0 | | 2750,0 | 8,0 | 11,59 ± 0,00 | 27,59 ± 1,06 |
| 13 | 13,2 | 3,2 | | 3838,9 | 12,4 | 8,16 ± 0,01 | 16,75 ± 0,59 |
| 14 | 35,0 | 2,0 | | 2750,0 | 8,0 | 11,67 ± 0,01 | 26,49 ± 0,53 |
| 15 | 56,8 | 0,8 | | 3838,9 | 3,6 | 15,96 ± 0,01 | 35,98 ± 0,48 |
| 16 | 56,8 | 0,8 | | 1661,1 | 3,6 | 16,87 ± 0,01 | 26,83 ± 0,35 |
| 17 | 35,0 | 0,0 | | 2750,0 | 8,0 | 14,99 ± 0,01 | 14,07 ± 0,49 |
| 18 | 13,2 | 0,8 | | 3838,9 | 12,4 | 9,47 ± 0,04 | 9,89 ± 0,25 |
| 19 | 56,8 | 3,2 | | 1661,1 | 12,4 | 13,27 ± 0,03 | 17,06 ± 0,58 |
| 20 | 13,2 | 0,8 | | 1661,1 | 12,4 | 7,91 ± 0,02 | 9,97 ± 0,18 |
| 21 | 35,0 | 2,0 | | 1000,0 | 8,0 | 17,40 ± 0,06 | 19,10 ± 0,11 |
| 22 | 56,8 | 3,2 | | 1661,1 | 3,6 | 22,32 ± 0,03 | 31,28 ± 0,10 |
| 23 | 35,0 | 2,0 | | 2750,0 | 15,0 | 10,50 ± 0,03 | 11,64 ± 0,09 |
| 24 | 13,2 | 3,2 | | 1661,1 | 3,6 | 13,67 ± 0,03 | 25,78 ± 0,19 |
| 25 | 56,8 | 0,8 | | 1661,1 | 12,4 | 12,64 ± 0,04 | 21,86 ± 0,73 |
| 26 | 13,2 | 0,8 | | 3838,9 | 3,6 | 12,04 ± 0,00 | 28,06 ± 0,58 |
| 27 | 56,8 | 3,2 | | 3838,9 | 12,4 | 14,98 ± 0,06 | 28,41 ± 0,30 |
| 28 | 56,8 | 0,8 | | 3838,9 | 12,4 | 14,58 ± 0,04 | 26,49 ± 0,42 |

Legenda; resultados expressos pela média ± desvio padrão (n = 3). Respostas para antocianinas expressas em miligramas equivalentes a malvidina-3-glicosídeo por grama de amostra e para compostos fenólicos totais em miligramas equivalentes a ácido gálico por grama de amostra.

Fonte: Autor (2023)

5.1.1 Compostos fenólicos

Considerando-se a extração por ultrassom pelo delineamento experimental, o teor de compostos fenólicos variou de $9,88 \pm 0,25$ a $64,27 \pm 1,24$ mg EAG g⁻¹ de amostra de bagaço de uva liofilizado.

De acordo com a análise de variância realizada (Tabela 5), os resultados do teste F demonstraram resultados satisfatórios tanto para a regressão quanto para os resíduos. Isso sugere que o modelo possui capacidade preditiva. Dessa forma, o valor P associado ao teste F indica que o modelo é estatisticamente significativo. Além disso, o valor F para a Falta de Ajuste indica que tanto o modelo quanto a falta de ajuste são significativos. Isso também se aplica ao valor F para a Falta de Ajuste, o qual demonstra que a falta de ajuste é significativa. É relevante ressaltar que apenas 1,03% de probabilidade está associada à ocorrência de um valor F tão expressivo para a falta de ajuste devido a ruídos. Os termos do modelo, nomeadamente A (concentração de etanol), B (concentração de ácido), C (potência de ultrassom), D (percentual de massa) e D² (percentual de massa ao quadrado), revelam-se significativos, uma vez que seus valores de p-valor são inferiores a 0,05.

Tabela 5 - Resultados ANOVA para o teor de compostos fenólicos.

| Fonte | Soma dos quadrados | Grau de liberdade | Média quadrada | Valor de F | Valor de P |
|-----------------|--------------------|-------------------|----------------|------------|------------|
| Modelo | 3081,01 | 5 | 616,20 | 16,89 | < 0,0001 |
| A-Etanol | 373,10 | 1 | 373,10 | 10,23 | 0,0042 |
| B-Ácido Cítrico | 165,47 | 1 | 165,47 | 4,53 | 0,0446 |
| C-Potência | 305,84 | 1 | 305,84 | 8,38 | 0,0084 |
| D-Massa | 587,28 | 1 | 587,28 | 16,09 | 0,0006 |
| D ² | 228,22 | 1 | 228,22 | 6,25 | 0,0203 |
| Resíduo | 802,75 | 22 | 36,49 | | |
| Falta de ajuste | 797,94 | 19 | 42,00 | 26,15 | 0,0103 |
| Erro Puro | 4,82 | 3 | 1,61 | | |

Fonte: Autor (2023)

O coeficiente de determinação ajustado encontrado (R²) para o modelo foi de 0,75, demonstrando que o modelo encontrado explica 75% da variação dos dados encontrados.

Tabela 6 - R² obtido para o teor de compostos fenólicos.

| Análise estatística | Resultado |
|-------------------------|-----------|
| Desvio padrão | 6,04 |
| Média | 25,80 |
| D.P. % | 23,41 |
| R ² | 0,7933 |
| R ² Ajustado | 0,7463 |
| R ² previsto | 0,5783 |
| Precisão adequada | 15,2843 |

Fonte: Autor (2023)

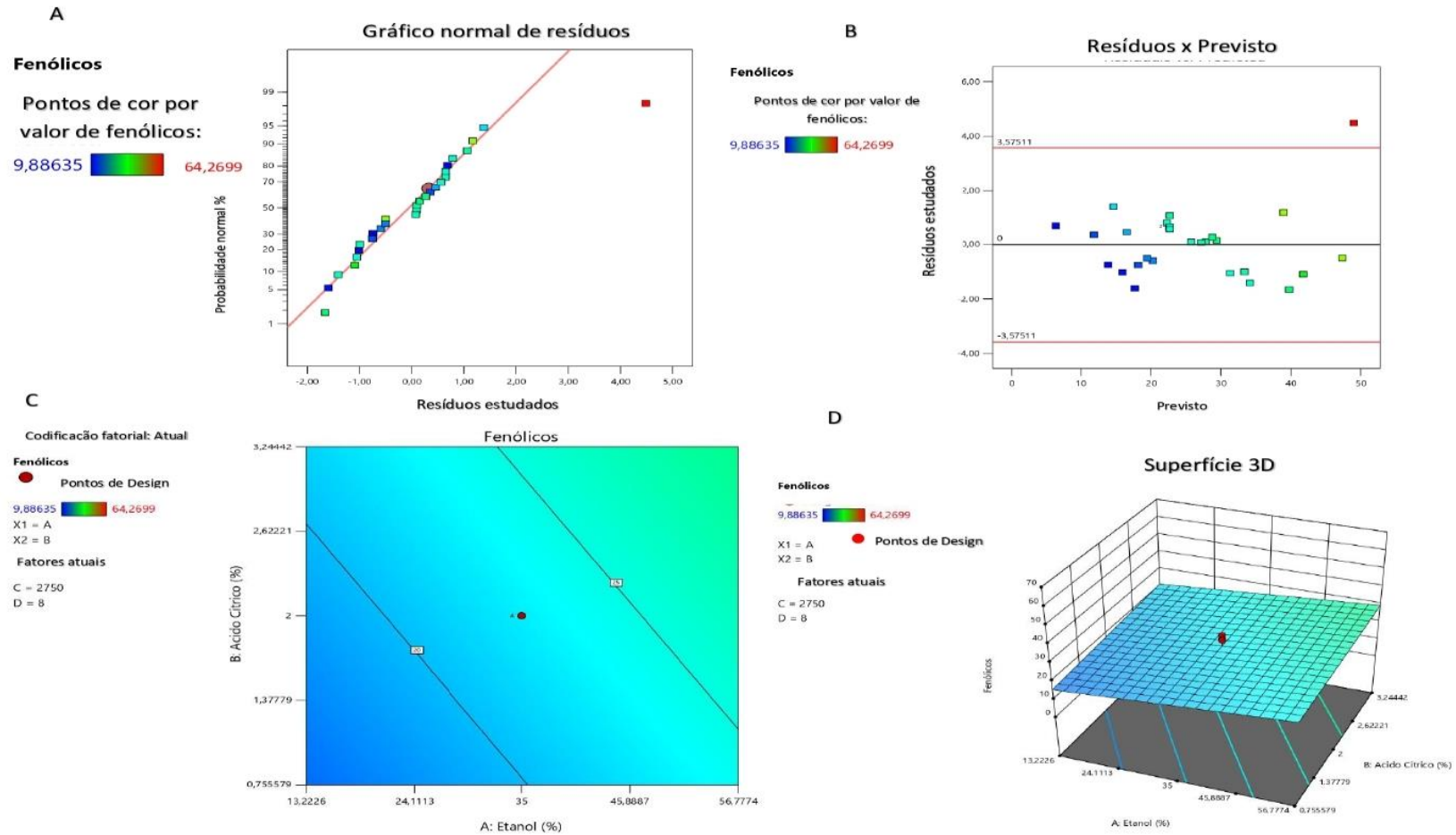
Na Figura 9, pode-se verificar a influência da potência, da concentração de ácido cítrico, da concentração de massa de resíduo e da concentração de etanol sobre o teor de compostos fenólicos, onde são apresentados o gráfico de normalidade (Figuras 9A) e as superfícies de resposta (Figuras 9B) obtidas pelo planejamento experimental.

O modelo quadrático ajustado à desejabilidade mostrou-se mais adequado que o linear e, portanto, ele foi selecionado para mostrar as condições otimizadas para a extração dos compostos fenólicos presentes no bagaço da uva, conforme observa-se na equação 4:

$$\begin{aligned}
 \text{Fenólicos} = & -415,85662 - 7,54149 \text{ Etanol} + 143,24816 \text{ Ácido Cítrico} + \\
 & 0,231967 \text{ Potência} + 20533514 \text{ Percentual de massa} + 3,22714 \text{ Etanol} * \\
 & \text{Percentual de massa} - 13,16177 \text{ Percentual de massa}^2
 \end{aligned}
 \tag{4}$$

A equação demonstra que as melhores condições para extração de CF são potência alta, maior concentração de ácido cítrico, uso de solvente hidro alcoólico e menor percentual de massa. Usando-se estes parâmetros, boas recuperações foram obtidas usando-se o método desenvolvido.

Figura 10 - A) Gráfico de normalidade de resíduo para teor de compostos fenólicos. B) Gráfico resíduo x preditivo para teor de compostos fenólicos. C) Superfície de resposta para compostos fenólicos. D) Superfície de resposta 3D para compostos fenólicos.



Fonte: Autor (2023)

5.1.2 Antocianinas monoméricas

Considerando-se a extração por ultrassom pelo delineamento experimental, o teor de antocianinas monoméricas variou de $7,28 \pm 0,01$ a $22,32 \pm 0,02$ mg equivalente a malvidina-3-glicosídeo g^{-1} de amostra de bagaço de uva liofilizado.

A equação (5) foi obtida para representar o teor de antocianinas monoméricas, através do modelo construído a partir dos parâmetros significativos obtidos pela regressão, estando dentro das faixas estudadas de concentração de etanol (A), concentração de ácido cítrico (B), potência do ultrassom (C) e percentual de massa (D).

$$\begin{aligned} \text{Antocianinas} = & 16,986 + 0,198 \text{ Etanol} - 0,864 \text{ Ácido Cítrico} - \\ & 0,002 \text{ Potência} - 0,896 \text{ Percentual de massa} + 0,029 \text{ Etanol} * \text{Ácido Cítrico} + \\ & 0,0001 \text{ Potência} * \text{Percentual de massa} - 0,002 \text{ Etanol}^2 \end{aligned} \quad (5)$$

A equação em termos de fatores reais pode ser usada para fazer previsões sobre a resposta para determinados níveis de cada fator.

De acordo com a análise de variância (Tabela 7), o teste F apresentou resultados satisfatórios, tanto para a regressão como para os resíduos, indicando que o modelo pode ser considerado preditivo. O valor F de falta de ajuste de 1,06 implica que este parâmetro não é significativo em relação ao erro puro. Há uma chance de 55,86% de que um valor F de falta de ajuste tão grande possa ocorrer devido a ruído. A, D são termos de modelo significativos já que p-valor $< 0,05$.

Tabela 7 - Resultados ANOVA para o teor de antocianinas monoméricas.

| Fonte | Soma dos quadrados | Grau de liberdade | Média quadrada | Valor de F | Valor de P |
|------------------|--------------------|-------------------|----------------|------------|------------|
| Modelo | 310,22 | 7 | 44,32 | 15,90 | < 0.0001 |
| A-Etanol | 187,22 | 1 | 187,22 | 67,18 | < 0.0001 |
| B-Ácido Cítrico | 0,8017 | 1 | 0,8017 | 0,2877 | 0,5976 |
| C-Potência | 3,85 | 1 | 3,85 | 1,38 | 0,2535 |
| D-Massa | 91,22 | 1 | 91,22 | 32,73 | < 0.0001 |
| AB | 9,98 | 1 | 9,98 | 3,58 | 0,0730 |
| CD | 8,36 | 1 | 8,36 | 3,00 | 0,0986 |
| A ² | 8,79 | 1 | 8,79 | 3,15 | 0,0910 |
| Resíduo | 55,74 | 20 | 2,79 | | |
| Falta de ajuste | 47,78 | 17 | 2,81 | 1,06 | 0,5586 |
| Erro | 7,96 | 3 | 2,65 | | |
| Correlação Total | 365,96 | 27 | | | |

Fonte: Autor (2023)

O coeficiente de determinação ajustado encontrado (R^2) para o modelo foi de 0,85, o que demonstra que o modelo encontrado explicou 85 % da variação dos dados encontrados.

Com isso, verificou-se um desvio padrão de 1,67 % em relação ao R^2 previsto. Entretanto, o R^2 foi ajustado e está em razoável concordância com o R^2 previsto, ou seja, o R^2 ajustado é uma versão modificada do R^2 previsto que foi ajustado para o número de preditores no modelo, onde o R^2 previsto foi de 0,71 e o R^2 ajustado foi de 0,79, obtendo-se um desvio padrão de 12,57 %, com uma precisão adequada de 14,85.

Tabela 8 - R^2 para o teor de antocianinas monoméricas.

| Análise estatística | Resultado |
|---------------------|-----------|
| Desvio padrão | 1,67 |
| Média | 13,28 |
| D.P. % | 12,57 |
| R^2 | 0,8477 |
| R^2 ajustado | 0,7944 |
| R^2 previsto | 0,7127 |
| Precisão adequada | 14,8475 |

Fonte: Autor (2023)

Na Figura 11, é possível verificar a influência da potência, da concentração de ácido cítrico, da concentração de massa de resíduo e da concentração de etanol sobre o teor de antocianinas monoméricas, onde são apresentados os gráficos de

normalidade (Figura 11A e 11B) e as superfícies de resposta (Figura 11C e 11D) obtidas pelo planejamento experimental.

5.1.3 Correlação entre compostos fenólicos e antocianinas monoméricas

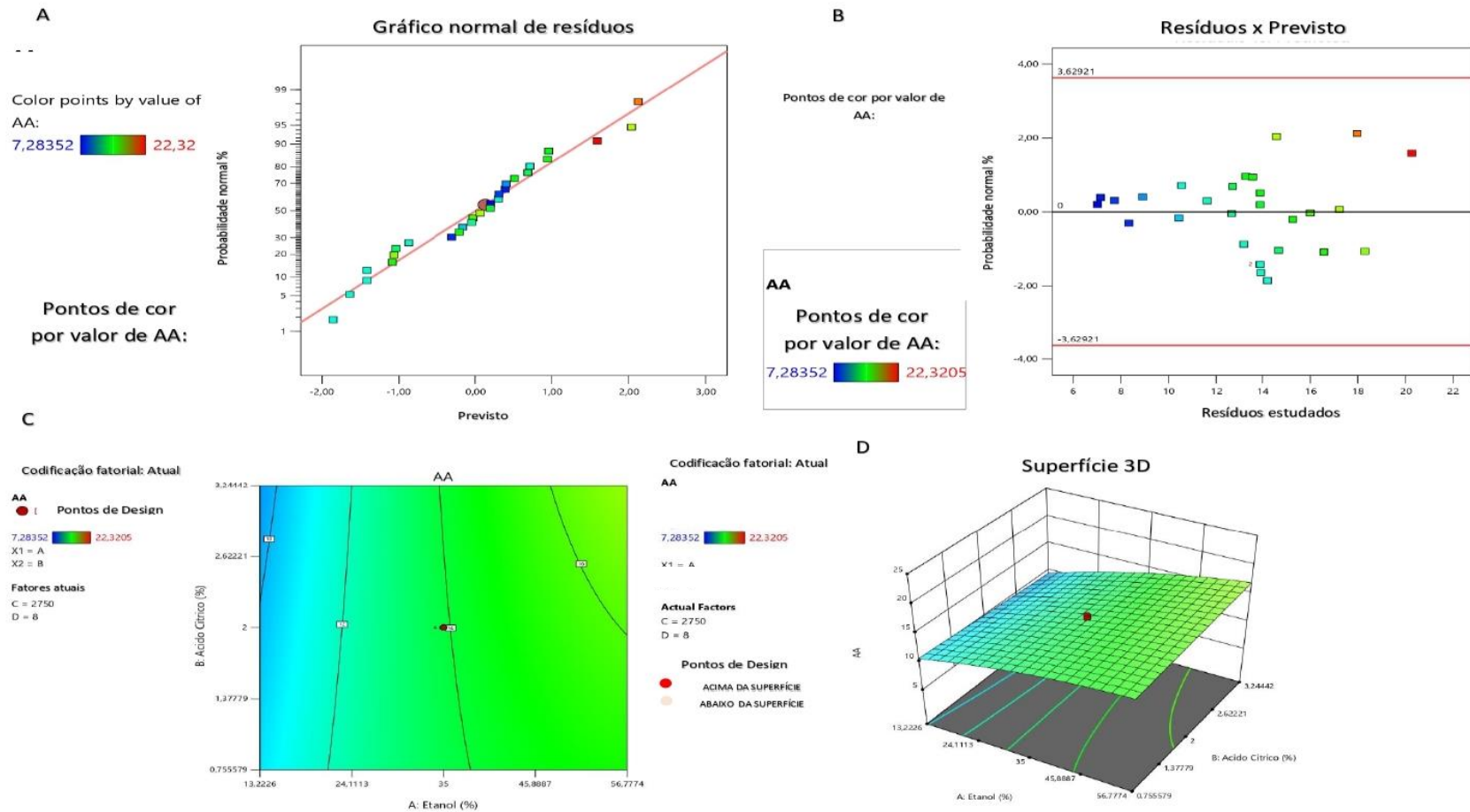
A correlação entre o teor de compostos fenólicos e o teor de antocianinas monoméricas foi medida através do coeficiente de correlação linear de Person, onde pôde-se perceber que o "ρ de Pearson", que mede o grau da correlação entre o teor de compostos fenólicos e antocianinas monoméricas, indica uma correlação positiva forte, onde considera-se que quanto mais o resultado está perto de 1 (independente do sinal) maior é o grau de dependência estatística linear entre as variáveis (FILHO; JUNIOR, 2009), sendo que o R^2 foi de 0,8182, o que significa que, 81,82 % do teor de compostos fenólicos é representado pelo teor de antocianinas, maior resultado ao encontrado por Abe *et al.* (2007).

Em estudo realizado pelos autores supracitados, com as cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. para determinação da capacidade antioxidante e de compostos fenólicos totais, incluindo resveratrol, antocianinas e outros flavonoides, estes observaram que o teor de antocianinas apresentou correlação forte com a capacidade antioxidante ($R^2 = 0,93$), enquanto entre fenólicos totais e antocianinas foi moderada a correlação apresentada ($R^2 = 0,65$). Essa moderada correlação representa a presença de outros fenólicos, como as catequinas, epicatequinas, quercetinas, caempferol e ácidos hidrocínâmicos.

Assim, o estudo de correlação deste trabalho evidencia que, por mais que as antocianinas pertençam à classe dos compostos fenólicos, outras subclasses também são mensuradas pela metodologia de Folin, mesmo assim a correlação obtida foi forte. Isso demonstra que os compostos fenólicos presentes na amostra são antociânicos, mesmo que outras classes também tenham sido mensuradas.

Vale ressaltar que os resultados encontrados de antocianinas e compostos fenólicos dependem da variedade da uva utilizada, das práticas de cultivo e do processo de vinificação, assim, tendo variabilidade frente a outros autores.

Figura 11 - A) Gráfico de normalidade de resíduo para teor de antocianinas monoméricas. B) Gráfico resíduo x preditivo para teor de antocianinas monoméricas. C) Superfície de resposta para antocianinas monoméricas. D) Superfície de resposta 3D para antocianinas monoméricas.



Fonte: Autor (2023)

5.2 Extrato otimizado

Considerando os valores obtidos para antocianinas monoméricas e compostos fenólicos por meio do planejamento experimental, a condição determinada como a mais adequada, dentro dos limites avaliados estatisticamente, foi a utilização de 3838 W L⁻¹ de potência, 3,24 % de ácido cítrico, etanol 70 % e concentração de massa de 1 %, onde os valores obtidos para compostos fenólicos, antocianinas monoméricas e atividade antioxidante (ABTS e FRAP) para o extrato líquido do bagaço de uva e para o controle de ácido cítrico podem ser verificados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados para antocianinas monoméricas, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (ABTS e FRAP) nas condições otimizadas de extração por sistema de ultrassom do extrato otimizado previsto e obtido e do controle de ácido cítrico.

| | Antocianinas (mg equivalente a malvidina-3-glicosídeo g ⁻¹ de amostra) | Compostos Fenólicos (mg equivalente a ácido gálico g ⁻¹ de amostra) | ABTS (μmol equivalente Trolox g ⁻¹ de amostra) | FRAP (μmol Eq Fe (II) g ⁻¹ de amostra) |
|--------------------------|---|--|---|---|
| Resultados previstos | 19,78 | 62,35 | - | - |
| Resultados experimentais | 16,76 ± 2,31 | 65,15 ± 4,35 | 43,70 ± 6,25 | 205,73 ± 10,41 |
| Controle | 0,00 ± 0,00 | 0,43 ± 0,01 | 2,67 ± 0,65 | 21,36 ± 0,94 |

Legenda: Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n = 3).
Fonte: Autor (2023)

Os valores obtidos na condição otimizada para compostos fenólicos foram em média de 65,15 ± 4,35 mg EAG g⁻¹ de amostra. Valores condizentes com os preditos com a equação codificada obtida para representar compostos fenólicos que foi 62,35 mg EAG g⁻¹ de amostra. No teste T realizado, o valor de p foi igual a 0,16 com nível de significância de 5%, demonstrando que não houve diferença significativa entre estes resultados.

Comparativamente a outros estudos, é possível observar que os resultados obtidos no presente estudo estão em um patamar superior. Por exemplo, no trabalho de Drevelegka & Goula (2020), foi obtido valor de 48,76 mg EAG g⁻¹ no bagaço de uva, usando a extração de ultrassom a 56 °C, razão solvente/sólido de 8 mL g⁻¹, amplitude de 34 % e tempo de 20 min com etanol 53 % v/v, após pré-tratamento com

celulase, na concentração de 4% p/p, tempo de 240 min e razão água/bagaço de 2 mL g⁻¹.

Em um estudo realizado por Medeiros (2021), a melhor extração de CFT por ultrassom apresentou resultado de 51,730 mg EAG g⁻¹ de base seca, quando se utilizou intensidade de 330 W cm⁻² e tempo de 9 min, usando uma solução etanólica a 50% na diluição de 1:18 (g mL⁻¹) (farinha de resíduo de uva: solvente).

Rockenbach *et al.* (2011) investigaram o teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante do bagaço da vinificação das variedades de uvas Cabernet Sauvignon, Merlot, Bordô e Isabel, e descobriram que o bagaço de Cabernet Sauvignon teve o maior teor de compostos fenólicos totais (74,75 mg EAG g⁻¹). Neste estudo, os autores realizaram a extração através da pulverização da amostra com nitrogênio líquido, depois adicionaram 1 g do material em 50 mL de metanol para extração em Turrax e por fim, a amostra foi filtrada em papéis filtro.

Em relação a antocianinas monoméricas, a média dos valores obtidos na condição otimizada foi de 16,76 ± 2,31 mg equivalente a malvidina-3-glicosídeo g⁻¹ de amostra. Valores condizentes com o predito de 19,78 mg equivalente a malvidina-3-glicosídeo g⁻¹ de amostra, obtido com a equação codificada obtida para representar antocianinas. No teste T, observou-se diferença significativa entre estes resultados, onde o valor de p foi igual a 0,04 (nível de significância de 5%).

Os resultados otimizados mostraram-se superiores quando comparados aos encontrados por Mazza (2017), onde o teor de antocianinas monoméricas presentes nos extratos de uva *Vitis labrusca* obtidos por ultrassom variou de 4,53 ± 6 a 6,85 ± 11 mg equivalente a malvidina-3-glicosídeo g⁻¹ de bagaço de uva. O referido autor utilizou frequência de 20 kHz, tempo de extração de 3 minutos, em sistema batelada de 40 mL. Como solvente, foi utilizada uma solução hidroetanólica 50 % (v/v) e temperatura de 26 ± 2°C. Os fatores avaliados foram a potência de ultrassom (1000 a 3000 W L⁻¹), a razão sólido:líquido (1:5 a 1:15) e a porcentagem de ácido cítrico adicionado à solução (0 a 3 %).

No estudo de Rockenbach *et al.* (2011), para extratos do bagaço da uva apresentaram concentrações de antocianinas, em meio hidroalcoólico, de 1,930 mg g⁻¹ equivalente a malvidina-3-glicosídeo em peso seco na concentração de 70 % e 1,950 mg g⁻¹ equivalente a malvidina-3-glicosídeo em peso seco na concentração de 50 % para a variedade Ancelota; e 7,7 mg g⁻¹ equivalente a malvidina-3-glicosídeo nas concentrações de 70 e 50% para a variedade Tannat. Em outro estudo com bagaço

de uva realizado por Pontes (2014), a variedade Cabernet Sauvignon foi submetida a extração com etanol 40 % (v/v) com agitação por 24 horas e apresentou uma concentração de 20,93 mg equivalente a malvidina-3-glicosídeo g⁻¹ de base seca.

Visto o exposto em relação a compostos fenólicos e antocianinas monoméricas, na condição otimizada, é possível observar que o aumento da potência, do percentual de etanol e de ácido cítrico, juntamente com a menor porcentagem de massa levou a um aumento no teor de compostos fenólicos e antocianinas monoméricas por grama de resíduo.

A eficiência da técnica de extração por ultrassom, pode ser influenciada por variáveis como tipo e concentração do solvente, razão solvente/sólido, pH, temperatura, tempo de extração, amplitude/potência, entre outras (TEIXEIRA, 2018).

O ponto que favoreceu a extração, de forma mais acentuada, foi o aumento da relação líquido:sólido, ou seja, menor porcentagem de massa, que faz com que o solvente consiga maior permeabilidade permitindo assim uma maior extração de compostos (KHADHRAOUI *et al.*, 2021).

Como o ultrassom é uma onda, características como potência e amplitude, podem influenciar a cavitação acústica e também nas taxas de extração (CHEMAT *et al.*, 2017).

A implosão/colapso gera compressão adiabática rápida dos gases e vapores dentro das bolhas ou cavidades e, como resultado, são produzidas altas pressões. Isso gera a quebra das paredes celulares do vegetal, facilitando a entrada no conteúdo celular, o aumento da solubilidade do analito, o acesso de solvente na matriz da amostra e a maior área superficial entre a fase sólida e líquida, devido a maior transferência de calor e massa, resultando em melhor extração (SUSLICK *et al.*, 2000; BARBA *et al.*, 2016; GONZÁLEZ-CENTENO *et al.*, 2015; MAZZA, 2017).

O desenvolvimento de procedimentos de extração que possibilitem a utilização de solventes menos agressivos ao meio ambiente e que sejam usados em menor quantidade tem sido proposto como uma alternativa para o desenvolvimento da chamada “química verde”. Correlaciona-se que um único solvente muitas vezes, não é capaz de realizar uma extração com valores de rendimentos eficazes, para isso a junção de dois solventes, tais como etanol/água, promovem interações moleculares diante dos compostos presentes na espécie botânica auxiliando assim no processo de extração (SILVA *et al.*, 2021).

Um extrator hidroalcoólico pode favorecer o isolamento de compostos polares médios. Etanol puro não confere o nível ótimo de antioxidantes nos extratos de bagaço de uva, conforme descrito por Drevelegka & Goula (2020). Segundo os mesmos autores, as características físico-químicas (como baixo ponto de ebulição) do etanol tornam as operações de recuperação de solventes mais fáceis e com menor custo de energia. Também, o meio em que os polifenóis são finalmente ressuspensos tem implicações em seus destinos e aplicações, portanto, uma ressuspensão do extrato bioativo em água aumenta suas aplicações industriais.

Os mesmos ainda relatam que a solubilidade fenólica pode ser melhorada com uma maior concentração de etanol, o qual desempenha um papel importante na ruptura das ligações de hidrogênio e ligações hidrofóbicas existentes entre fenólicos-proteínas e fenólicos-celulose no sistema água-etanol (DREVELEGKA; GOULA, 2020).

Mazza (2017) avaliou que o aumento na concentração de ácido cítrico no solvente extrator acarretou um leve aumento da extração de compostos fenólicos. Além disso, também foi verificado que as antocianinas possuem diferentes formas de ressonância, onde a forma mais estável é a do cátion flavílio gerando a cor vermelha, predominante em pHs abaixo de 2 (GRIGORAS *et al.*, 2012; WEBER; BOCH; SCHIEBER, 2017). A estabilidade das antocianinas é favorecida em meio ácido, devido a glicosilação de grupos hidroxila e a acilação de açúcares (TEIXEIRA, 2018). O ácido cítrico é o segundo ácido orgânico mais abundante no vinho, ou seja, está presente de forma natural, podendo ser recuperado no bagaço da uva (KOCABEY; YILMAZTEKIN; HAYALOGLU, 2016). Por esta razão, foi o escolhido como agente acidificante no processo de extração. Vale ressaltar que os valores encontrados para compostos fenólicos e antocianinas nos diferentes estudos dependem da variedade da uva utilizada, das práticas de cultivo e do processo de vinificação.

Em seguida foi avaliada a atividade antioxidante medida pelos métodos ABTS e FRAP no extrato otimizado líquido, realizado em triplicata que foram, de $43,70 \pm 6,25$ $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ de amostra de bagaço de uva liofilizado e de $685,7 \pm 42,72$ $\mu\text{mol Eq Fe (II) g}^{-1}$ de amostra de bagaço de uva liofilizado, respectivamente.

O valor de médio de $43,70 \pm 6,25$ $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ de amostra para o método ABTS, foi semelhante aos obtidos no estudo de Makara (2015), que realizou a extração dos compostos bioativos com soluções hidroetanólicas, na proporção soluto/solvente de 1:20 (w/v), utilizando para obtenção do extrato incubadora *shaker*

a 25 °C e 130 RPM durante 4 horas. Para o extrato da espécie Bordô os valores encontrados foram em média de $45,07 \pm 1,06 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ de amostra de extrato, para *Cabernet Sauvignon* a atividade foi em média de $52,77 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ de amostra de extrato, para a variedade *Merlot* foi em média de $51,56 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ de amostra de extrato, e a variedade *Tannat* apresentou a menor atividade ($39,42 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ de amostra de extrato).

No estudo de Mazza (2017) a atividade antioxidante medida pelo método ABTS nos extratos variou de 442 ± 37 a $939 \pm 110 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$, onde o melhor resultado para a extração do bagaço de uva obtido foi utilizando sistema de ultrassom com 2000 W de potência, 3 % de ácido cítrico e razão sólido:líquido 1:10.

Já em um estudo de Rockenbach *et al.* (2011), níveis de atividade antioxidante mais elevados foram encontrados para a variedade *Tannat*, observados nos extratos obtidos com acetona nas concentrações de 50 e 70% (v/v), de $466,4$ e $476,2 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$, respectivamente. Para a variedade *Anceleta*, os maiores valores de atividade antioxidante foram obtidos com solvente nas concentrações de 50 e 70% (v/v), de $400,7$ e $389,9 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ para etanol e $403,4$ e $393,9 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ para acetona, respectivamente. As amostras utilizadas foram trituradas (60 mesh) e desengorduradas em extrator *Soxhlet*, utilizando solvente hexano, durante 6 horas a 60°C. O resíduo do bagaço foi submetido à extração com diferentes sistemas solventes. Os extratos foram preparados com material seco desengordurado, utilizando, como solventes extratores, as soluções água:etanol e acetona, acidificados com HCl a 0,1 %. A extração foi procedida sob agitação mecânica e ao abrigo da luz no intervalo de 2 horas, sendo posteriormente filtrados em papel filtro e transferidos para balão volumétrico com volume final ajustado.

Em relação a metodologia FRAP, o poder de redução foi de $205,73 \pm 10,41 \mu\text{mol Eq Fe (II) g}^{-1}$ de amostra, o qual foi equivalente aos obtidos, também, por Rockenbach *et al.* (2011), para os quais as atividades antioxidantes dos extratos de casca e semente das espécies de uva Primitivo, Sangiovese, Pinot Noir, Negro Amaro, Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*) e Isabel (*Vitis labrusca*) foram determinada, sendo que os resultados variaram de $145,4$ para $436,2 \mu\text{mol Fe (II) g}^{-1}$ e $294,2$ para $2149,2 \mu\text{mol Fe (II) g}^{-1}$, dos extratos de casca e semente, respectivamente. Os maiores valores foram encontrados para as sementes da variedade Pinot Noir ($2149,2 \mu\text{mol Fe (II) g}^{-1}$) e nos extratos de pele da variedade Isabel ($436,2 \mu\text{mol Fe (II) g}^{-1}$). Neste

estudo os autores prepararam o extrato utilizando metanol/água/ácido acético (80:20:5) por agitação mecânica por 1 h na ausência de luz a 4°C.

Com isso percebe-se que os extratos otimizados apresentaram atividade antioxidante próximos aos encontrados por outros autores, sendo que os resultados obtidos corroboram com o fato de que a extração mais eficiente ocorreu quando são aplicadas maiores potências de ultrassom, maiores concentrações de ácido cítrico, concentração de etanol de 70 % e menor concentração de massa. As variações de resultados entre autores podem ser atribuídas a maturidade, espécie e ao local de coleta dos frutos.

Por fim, foi realizado um controle positivo de ácido cítrico, preparado nas mesmas condições do extrato, sendo os resultados avaliados para compostos fenólicos, antocianinas monoméricas e atividade antioxidante (ABTS e FRAP).

Assim, nos resultados da Tabela 9 é possível observar que para antocianinas, compostos fenólicos e ABTS a interferência do ácido cítrico não foi significativa, sendo que a atividade se dá pela presença de compostos do bagaço da uva. Em relação aos resultados da metodologia de FRAP houve resultados significativos, demonstrando uma ação do ácido cítrico sob a atividade antioxidante do extrato. Desta forma, supõe-se que houve uma interferência do método, ou seja, como o ácido cítrico possui atividade antioxidante, o método FRAP conseguiu detectar esta ação, resultando em um resultado falso positivo. Sabendo-se que o ácido cítrico faz parte da classe de compostos antioxidantes, ligando-se ao oxigênio por competitividade e interrompendo a etapa de propagação por destruição (OETTERER *et al.*, 2006), quando utilizado na extração dos compostos presentes no bagaço da uva (Tabela 9), auxiliou na otimização dos resultados, podendo-se verificar atividade antioxidante dos compostos presentes no extrato do bagaço da uva.

Em relação a atividade antimicrobiana e antifúngica do extrato otimizado, pode-se observar através dos testes CIM, CBM e CFM, dispostos na Tabela 10, que, em comparação com o ácido cítrico líquido concentrado, o extrato, apresentou atividade antibacteriana pouco satisfatória.

Tabela 10 - Resultados para concentração inibitória mínima - CIM, concentração bactericida mínima - CBM e concentração fúngica mínima – CFM para o extrato líquido concentrado do bagaço de uva Bordô (Uva), para o ácido cítrico (C-) e para os controles positivos de Ampicilina (Amp) (para bactérias) e Nistatina (Nist) (para leveduras).

| Cepa | CIM | | | | CBM ou CFM | | | |
|------------------------------|---------|--------|-------------------------------|--------------------------------|------------|--------|-------------------------------|--------------------------------|
| | Uva (%) | C- (%) | Amp ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Nist ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Uva (%) | C- (%) | Amp ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Nist ($\mu\text{g mL}^{-1}$) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 0,62 | 0,62 | <7,8 | - | 2,5 | 1,25 | <7,8 | - |
| <i>Bacillus cereus</i> | 1,25 | 0,62 | 62,5 | - | 1,25 | 0,62 | 62,5 | - |
| <i>Salmonella entérica</i> | 2,5 | 1,25 | <7,8 | - | 2,5 | 2,5 | <7,8 | - |
| <i>Escherichia coli</i> | 2,5 | 1,25 | <7,8 | - | 2,5 | 2,5 | <7,8 | - |
| <i>Candida albicans</i> | >20 | >10 | - | <7,8 | - | - | - | <7,8 |
| <i>Candida tropicalis</i> | >20 | >10 | - | <7,8 | - | - | - | <7,8 |

Legenda: Os resultados são demonstrados como média \pm desvio padrão, n = 3.

Fonte: Autor (2023)

Verificou-se que a atividade do extrato otimizado do bagaço de uva contra *S. aureus* foi de 0,62 %, *B. cereus* foi de 1,25 %, *Salmonella* foi de 2,5 % e *E. coli* apresentou-se CIM de 2,5 %. Já o ácido cítrico, apresentou atividade similar, onde contra *S. aureus* foi de 0,62 %, *B. cereus* foi de 0,62 %, *Salmonella* foi de 1,25 % e *E. coli* apresentou-se CIM de 1,25 %.

Esses resultados se devem ao fato do ácido cítrico ser um composto de amplo uso como conservante. O ácido cítrico é um ácido orgânico que inibe os microrganismos através de um processo em que o pH ácido dentro da célula induz a danos e degradação da atividade enzimática, das proteínas e da estrutura molecular do DNA, bem como, destrói a membrana extracelular por perturbação do sistema de transporte de elétrons (MANI-LOPEZ *et al.*, 2012).

Com isso, o ácido cítrico atua como composto antimicrobiano, entretanto, ao utilizar-se juntamente com o bagaço da uva no extrato, não se verificou um aumento significativo da atividade, podendo-se então afirmar que o bagaço da uva não apresentou ação antimicrobiana significativa quando comparado com o ácido cítrico sozinho. Também, em comparação ao antibiótico Ampicilina e ao antifúngico Nistatina, a atividade foi menor para o extrato otimizado do bagaço de uva. Portanto, é possível que seja necessária uma maior concentração de bagaço de uva para a promoção da atividade antimicrobiana e antifúngica.

Entretanto, em comparação com um estudo de Radulescu *et al.* (2020), onde verificou-se que a concentração efetiva relatada de extratos de semente de uva para diferentes micro-organismos variou dentro de um amplo intervalo. Assim, CIMs a partir de 0,160 mg mL⁻¹ foram eficazes para *Staphylococcus aureus* e outros

microrganismos Gram-positivos, enquanto 4,00 mg mL⁻¹ inibiram o crescimento de *Escherichia coli* e 8,00 mg mL⁻¹ o crescimento de *Salmonella typhimurium*.

Da mesma forma, Martin *et al.* (2012), encontraram em seus estudos quanto ao potencial microbiano (CIM) para extratos etanólicos e metanólicos de sementes de uva Petit verdot, valores de 1,56 a 3,13 mg mL⁻¹, contra *S. aureus* e para extratos etanólicos e metanólicos do bagaço de uva das espécies Petit Verdot e Pinot Noir valores de 6,25 e 12,5 mg mL⁻¹ para *L. monocytogenes*, bem como, valores de 3,13 e 6,25 mg/mL, contra *S.aureus* para o bagaço das mesmas espécies.

Em um estudo de Souza (2013), que utilizou subprodutos de vinificação da uva tinta, variedade Bordô (*Vitis labrusca*), para produção de pó por liofilização, a amostra apresentou o maior efeito bactericida contra *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Apresentou também, efeito inibitório para *Salmonella*, mas não apresentou efeito bactericida, além disso, para *E. coli*, não foi demonstrada nenhuma atividade.

Assim, é possível observar que, através da literatura, os compostos fenólicos existentes no resíduo da uva bordô podem lesionar as membranas plasmáticas lipídicas e resultam em um extravasamento do conteúdo celular exercendo, assim, a atividade antimicrobiana. A ação bactericida dos compostos fenólicos se deve aos flavonoides e aos ácidos fenólicos. Portanto, diferentes respostas biológicas podem resultar da variação no perfil destas substâncias e, apesar de apresentarem alguns constituintes em potenciais, outros compostos podem estar agindo por sinergia, contribuindo para os efeitos benéficos (CZAMANSKI, 2013).

Em relação a ação antifúngica, a mesma foi influenciada pelo pH do extrato (2,5), onde os valores de pH ideal para crescimento de fungos e leveduras são geralmente próximos a 3,5 (TOURNAS *et al.*, 2001), portanto, promovendo o crescimento das leveduras e, desta forma, não houve ação antifúngica do extrato.

5.3 Estudo de estabilidade do extrato líquido concentrado

Após a determinação da atividade antioxidante e antimicrobiana relacionada ao extrato otimizado, realizou-se a concentração por evaporação do solvente. Este produto concentrado foi submetido ao estudo de estabilidade acelerado. Assim, as características físico-químicas no tempo zero foram determinadas e observou-se 89,69 % de umidade e 0,11 % de teor de cinzas, valores esperados por se tratar de um extrato líquido. García (2019) também observou em seu extrato líquido

concentrado de casca de uva da variedade Alicante Bouschet, 93,5 % de umidade e 0,14 % de teor de cinzas.

Avaliou-se também que os resultados no tempo zero para pH foi de 2,5, para acidez titulável foi de 9,51 % (m/v) e a quantidade de sólidos solúveis totais foram de 5,0 °Brix. O valor de pH está em consonância também com o estudo de García (2019) que encontrou valor de pH de 2,91, embora este autor tenha encontrado um menor teor de acidez titulável (4,62 %) e maior teor de sólidos solúveis totais (13,19 °Brix), possivelmente devido ao método de extração e a variedade da uva utilizados.

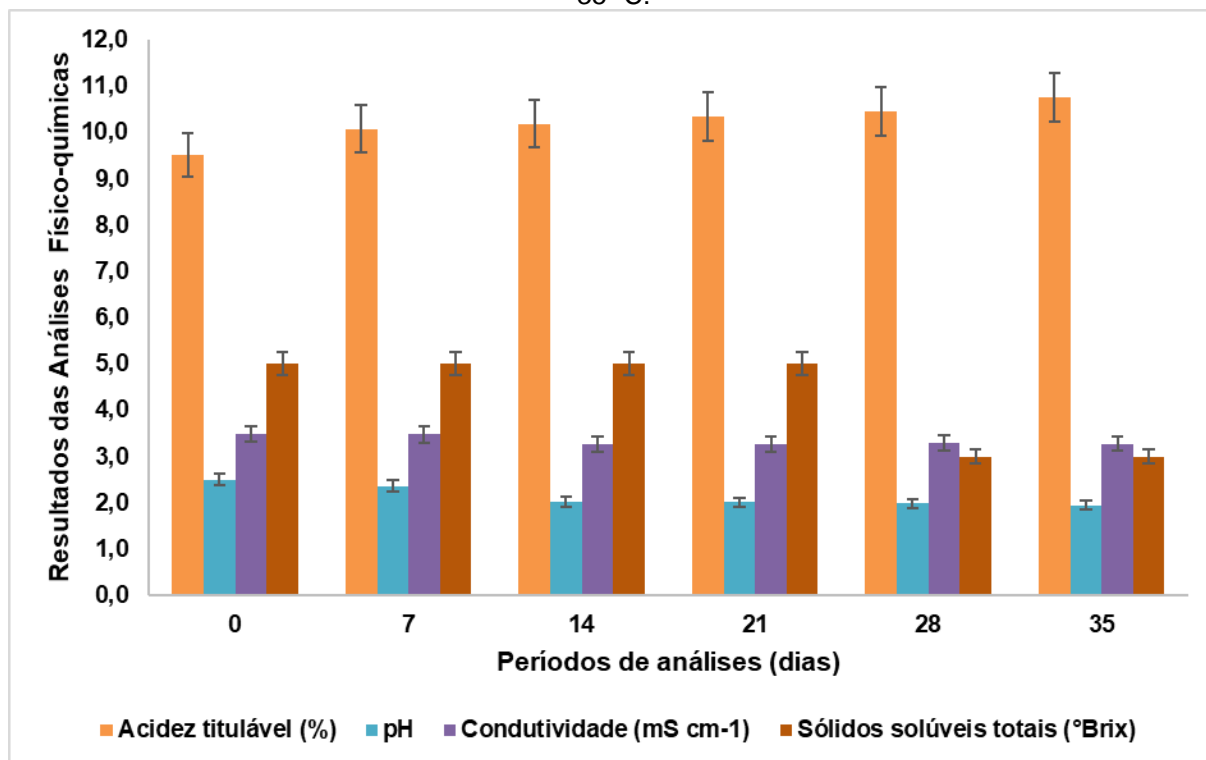
Para a condutividade, foi encontrado um valor médio de 3,49 mS cm⁻¹, onde a determinação da condutividade é uma forma de saber o quanto a solução analisada tem a capacidade de conduzir corrente elétrica. Delso *et al.* (2022) realizaram uma análise de condutividade em uvas Grenache (*Vitis vinifera* L.) colhidas manualmente na vila de Fuendejalón (Aragón, Espanha), as quais foram esmagadas e apresentaram condutividade de 1,4 mS cm⁻¹, o que mostra que o extrato de uva concentrado líquido possui relativa quantidade de sais a mais quando comparado com o suco de uva puro.

Em seguida, em relação ao estudo de estabilidade, para os tempos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias, na condição de temperatura de 35 °C, foram realizadas as análises de sólidos solúveis totais (°Brix), pH, condutividade (mS cm⁻¹) e acidez por titulação (%), onde o comportamento pode ser avaliado na Figura 12.

Mediante a aplicação do teste T, foi possível constatar a existência de diferença significativa entre o tempo zero e o tempo 35 dias para a análise de condutividade, bem como entre o momento inicial e após 7 e 35 dias para a avaliação do pH.

Observou-se que ocorreu uma diminuição no valor do pH ao longo do período estudado, correspondendo a um aumento na acidez. Essa acidez acentuada pode ser atribuída tanto à presença do composto ácido cítrico, que foi adicionado, quanto ao processo de extração do bagaço da uva. Logo após a maceração das uvas, tanto na produção de vinho quanto na extração de compostos, o processo de fermentação alcoólica se inicia em temperaturas elevadas. Esse processo resulta na produção de diversos ácidos, incluindo os ácidos succínico, láctico e acético, além dos ácidos predominantes (como málico, cítrico e tartárico), que têm a tendência de acidificar o ambiente (RIBEIRO *et al.*, 2018).

Figura 12 - Análises de sólidos solúveis totais (°Brix), pH, condutividade (mS cm⁻¹) e acidez por titulação (%) nos tempos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias na condição de temperatura de armazenamento de 35 °C.



Legenda: Com resultados demonstrados como média, n = 3 para cada período. * indica que houve diferença significativa.
Fonte: Autor (2023)

Em relação à avaliação visual, quanto às análises de condutividade elétrica e sólidos solúveis totais, é possível estabelecer correlações com as características organolépticas. Observou-se, em termos de aspecto físico, a formação de cristais na amostra após 35 dias. Essa formação pode ser atribuída à concentração de proteínas e açúcares presentes na amostra, que precipitaram após serem submetidos a temperaturas mais elevadas (Tabela 11). Isso, por sua vez, pode ter influenciado nos resultados das análises mencionadas anteriormente.

Conforme Martineli *et al.* (2018) destacaram, os ácidos orgânicos e os açúcares são componentes cruciais dentre os sólidos solúveis presentes na polpa de frutas, contribuindo para o sabor e a aceitabilidade pelo consumidor. Portanto, à medida que a fruta amadurece e é submetida ao processo de extração, a concentração de açúcares solúveis tende a aumentar, enquanto os ácidos orgânicos tendem a diminuir. Esse equilíbrio entre o doce e o azedo é vital para a percepção organoléptica desejada.

Assim, a concentração obtida por meio da extração e evaporação do bagaço da uva resultou em alta condutividade elétrica e um teor elevado de sólidos solúveis

(expressos em °Brix). No entanto, ao serem submetidos a uma temperatura de 35 °C, esses valores decaíram, como evidenciado.

Ainda, com relação as características organolépticas, a coloração e o odor (Tabela 11) não sofreram alteração ao longo dos 35 dias de estudo. Isso pode ser devido a estabilidade das antocianinas frente a proteção da luz com uso de frasco de vidro âmbar e baixo pH que propicia uma maior estabilidade da cor destes compostos (GARCÍA, 2019).

Tabela 11 - Análise das características organolépticas da amostra do extrato otimizado concentrado no tempo zero dias e após 35 dias de estudo de estabilidade, armazenado sob temperatura 35 °C, onde são avaliadas as características de cor, odor e aspecto.

| Características | Tempo zero dias | Tempo 35 dias |
|------------------------|------------------------------|--|
| Cor | Roxo intenso | Roxo intenso |
| Odor | Característico de vinho | Característico de vinho |
| Aspecto | Extrato concentrado, viscoso | Extrato concentrado, viscoso e com pequenos cristais (aspecto açucarado) |

Fonte: Autor (2023)

Na Tabela 12 pode-se observar os valores para compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante. Os valores encontrados são mais elevados (70,98 %, 88,64 % e 17,00 %, respectivamente para CF, AM e ABTS) aos encontrados por García (2019).

Quanto aos CF, AM e ABTS, na Figura 13, observou-se que há um decaimento gradual ao longo do período de armazenamento. Para CF houve decaimento de 62,35 %, para AM de 62,38 % e 33,87 % de redução para ABTS. Aplicando o teste T ($p < 0,05$) pode-se observar que houve diferença significativa entre o tempo zero e 35 dias, porém mantendo ainda valores acima do encontrado por García (2019) para Uva da variedade *Alicante Bouschet*.

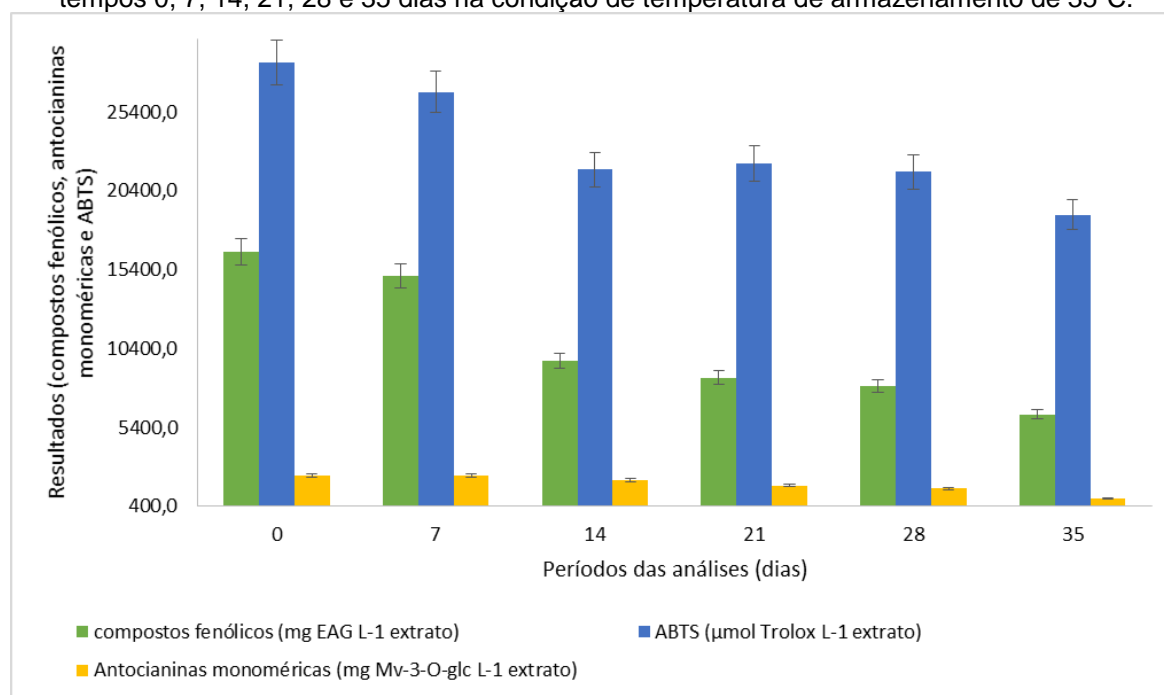
Tabela 12 - Comparação dos resultados de teor de compostos fenólicos (CF), teor de antocianinas monoméricas (AM) e atividade antioxidante (ABTS) obtidos no estudo de García (2019) e no presente estudo no tempo zero dias e no tempo 35 dias.

| Análises | Extrato concentrado de casca de uva da variedade Alicante Bouschet (GARCÍA, 2019) | Extrato concentrado do bagaço de uva da variedade Bordô no tempo zero dias (AUTOR, 2023) | Extrato concentrado do bagaço de uva da variedade Bordô no tempo 35 dias (AUTOR, 2023) |
|---|---|--|--|
| CF (mg eq. a ácido gálico L ⁻¹ de extrato) | 4801,80 ± 169,96 | 16544,33 ± 683,98 | 6229,48 ± 124,84 |
| AM (mg eq. a malvidina-3-glicosídeo L ⁻¹ de extrato) | 270,02 ± 8,66 | 2377,13 ± 0,04 | 918,076 ± 2,42 |
| ABTS (µmol Trolox L ⁻¹ de extrato) | 23905,19 ± 1819,28 | 28540,00 ± 1533,30 | 18873,3 ± 2230,10 |

Legenda: Os resultados são demonstrados como média ± desvio padrão, n = 3.

Fonte: García (2019); Autor (2023)

Figura 13 - Resultados das análises de compostos fenólicos, antocianinas monoméricas e ABTS nos tempos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias na condição de temperatura de armazenamento de 35°C.



Legenda: Média ± desvio padrão, n = 3; Resposta para antocianinas expressa em mg, equivalência a malvidina-3-glicosídeo L⁻¹ de extrato; para compostos fenólicos totais expressa em mg equivalente a ácido gálico L⁻¹ de extrato; para ABTS expressa µmol Trolox L⁻¹ de extrato.

Fonte: Autor (2023)

É possível observar que houve um decréscimo da concentração de antocianinas ao longo do período (de 2377 mg Mv-3-O-glc L⁻¹ extrato para 918 mg Mv-3-O-glc L⁻¹ extrato), que pode ser justificado pelas antocianinas possuírem a estrutura do cátion flavílico, que é estável e está presente nas soluções de pH abaixo

de 3 e sob proteção da luz, entretanto, são instáveis a temperatura, mesmo temperaturas de 25 ± 2 °C. Portanto, a temperatura é um dos possíveis fatores responsáveis pela degradação dos extratos armazenados a 35 °C, mesmo em abrigo da luz e com pH ácido.

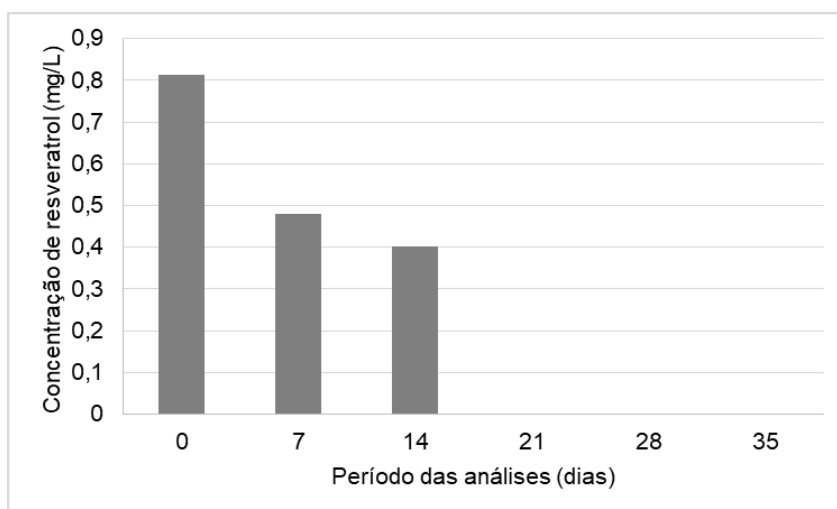
Da mesma forma, os compostos fenólicos, que são altamente instáveis à luz, oxigênio e a altas temperaturas, tiveram uma redução significativa da concentração após 14 dias de estudo de estabilidade (de 16544 mg EAG L⁻¹ de extrato para 9638 mg EAG L⁻¹ de extrato, chegando ao final em 6229 mg EAG L⁻¹ de extrato), o que pode ter refletido na diminuição significativa da atividade antioxidante, medida por ABTS, neste mesmo período (de 28540 μ mol Trolox L⁻¹ de extrato para 21740 μ mol Trolox L⁻¹ de extrato no 14º dia e decaindo ao final até 18873 μ mol Trolox L⁻¹ de extrato).

O mesmo comportamento de AM, CF e ABTS foi observada em um estudo de estabilidade do extrato concentrado extraído do resíduo da elaboração de vinho da variedade Petit Vedot estudado por Linhares (2020).

Portanto, é possível sugerir que os compostos responsáveis pela capacidade antioxidante a partir de duas semanas de armazenamento correspondem aos fenólicos totais que estavam presentes por todo o período de armazenamento.

Foi avaliado também a presença do composto resveratrol, quantificado por CLAE, para o extrato líquido concentrado do bagaço de uva durante o período de estabilidade em temperatura de 35 °C de armazenamento (Figura 14).

Figura 14 - Resultados da determinação da presença de Resveratrol nos tempos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias na condição de temperatura de armazenamento de 35 °C.



Legenda: Média \pm desvio padrão, n = 3; Resposta para concentração de resveratrol em mg L⁻¹.
Fonte: Autor (2023)

É possível observar que ao início a concentração de resveratrol na amostra se aproxima de $0,8 \text{ mg L}^{-1}$, decaindo gradativamente e sendo completamente degradado (0 mg L^{-1}) com 21 dias de armazenamento na temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$.

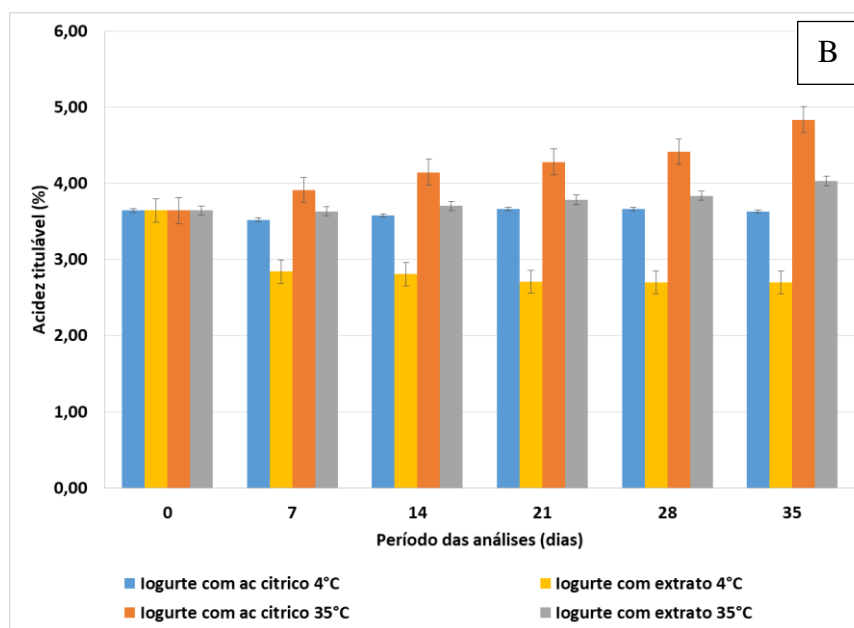
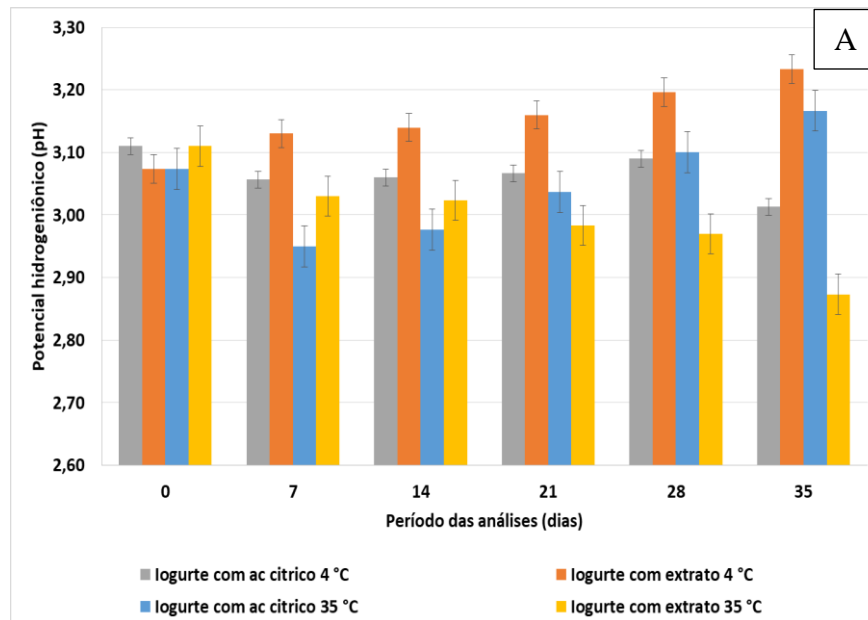
Os resultados do teor de resveratrol ao longo do estudo de estabilidade correspondem com os de compostos fenólicos e atividade antioxidante, onde com 14 dias houve uma redução. O resveratrol é um polifenol pertencente à família dos estilbenos, portanto é um composto fenólico com atividade antioxidante e presente principalmente em vinhos, sucos e chás e *in natura* em frutas como as uvas. A baixa estabilidade do resveratrol, é devido ao fato desta molécula sofrer o fenômeno de isomerização sob luminosidade, calor, variações de pH e na presença de enzimas, na qual com a posição *trans* de suas hidroxilas o composto apresenta bioatividade e na conformação *cis* encontra-se biologicamente inativo (CARDOSO *et al.*, 2019).

Portanto, os resultados sugerem que o extrato líquido concentrado de bagaço da uva Bordô (*Vitis labrusca*) foi manipulado seguindo as boas práticas de fabricação e, assim, manteve-se microbiologicamente seguro em relação a bactérias patogênicas durante o período de estocagem em condições aceleradas.

5.4 Estudo de estabilidade da aplicação em um produto alimentício

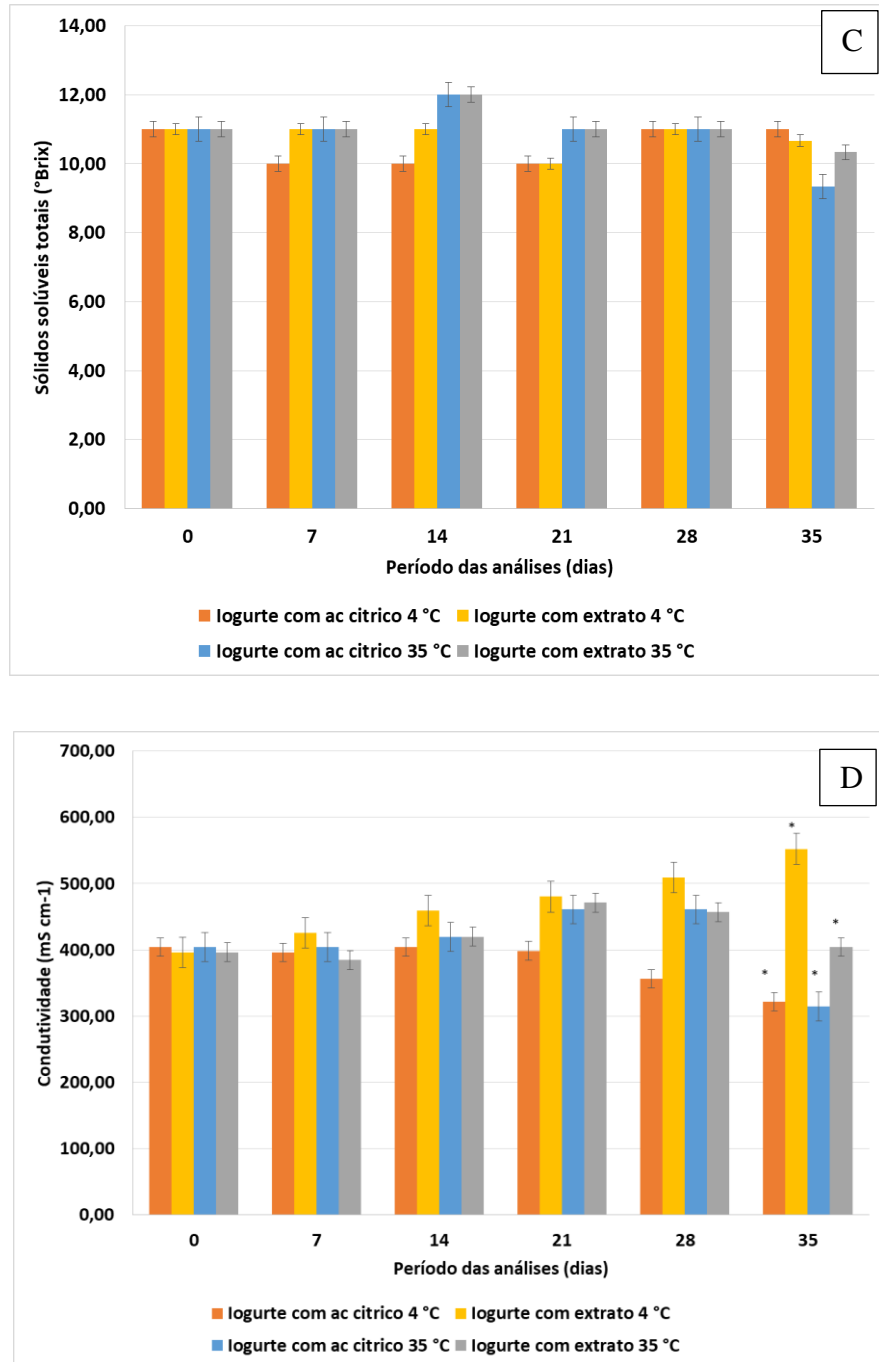
Após a realização do estudo de estabilidade do extrato de bagaço de uva, este foi incorporado a um produto alimentício, tipo iogurte, que também foi submetido ao estudo de estabilidade. Na Figura 15 estão apresentados os resultados das análises físico-químicas das formulações alimentícias testadas.

Figura 15 - Resultados de pH (A), acidez titulável (mL de solução M % v/m) (B), sólidos solúveis totais (°Brix) (C) e condutividade (mS cm⁻¹) (D) para as formulações do produto alimentício tipo iogurte com ácido cítrico (controle negativo) e com aplicação do extrato líquido concentrado do bagaço da uva, no estudo de estabilidade sob temperatura de 4 e 35 °C, nos tempos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias.
(Continua)



Legenda: * indica que houve diferença significativa. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão (n = 3) para cada período.

Figura 15 - Resultados de pH (A), acidez titulável (mL de solução M % v/m) (B), sólidos solúveis totais (°Brix) (C) e condutividade (mS cm⁻¹) (D) para as formulações do produto alimentício tipo iogurte com ácido cítrico (controle negativo) e com aplicação do extrato líquido concentrado do bagaço da uva, no estudo de estabilidade sob temperatura de 4 e 35 °C, nos tempos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias.
(Conclusão)



Legenda: * indica que houve diferença significativa. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão (n = 3) para cada período.

Fonte: Autor (2023)

Em relação ao pH e acidez titulável no tempo zero foi possível observar que, no controle negativo e na bebida tipo iogurte com o extrato líquido concentrado, os mesmos possuem média de pH próximo de 3 e acidez titulável em torno de 3,7 %,

isso devido ao uso do composto ácido cítrico como insumo acidificante do extrato e que foi utilizado em ambas as formulações. Assim, a acidez está diretamente ligada ao uso do ácido cítrico, o que promoveu também a manutenção do pH sob controle durante o período de armazenamento.

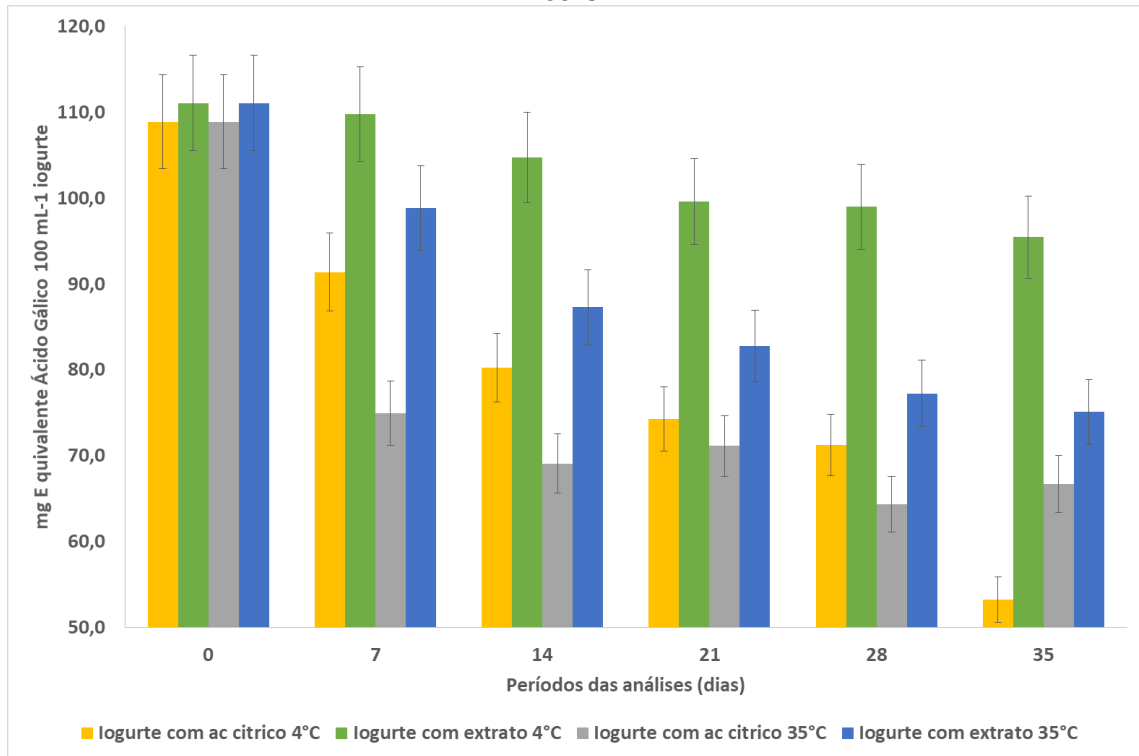
Para o iogurte tradicional o pH ideal está na faixa de 4,50 a 4,60. Como não foram adicionados microrganismos a formulação do presente estudo, como ocorre no iogurte tradicional, não houve transformação da lactose em ácido láctico, portanto, como no supracitado, o pH esteve diretamente ligado ao uso do ácido cítrico.

Na Figura 15B é possível observar que o produto tipo iogurte mostrou variações em torno de 3 a 5 mL de solução M % v/m e as formulações não apresentaram diferenças significativas durante o armazenamento. Freire *et al.* (2020) realizaram o preparo de leites fermentados sem extrato, com extrato de uva Isabel e com extrato de uva Rubi e submeteram a armazenamento, por 28 dias, sob refrigeração e observaram que o pH se manteve entre $3,97 \pm 0,01$ e $4,13 \pm 0,02$ e acidez titulável entre $0,67 \pm 0$ % e $1,1 \pm 0,2$ % de ácido láctico.

Com base nos valores de sólidos solúveis totais, os resultados observados no gráfico da Figura 15C variam de 9,00 a 12 °Brix e não houve diferenças significativas das formulações ao longo do estudo. Freire *et al.* (2020) obtiveram $6,5 \pm 0,3$ a $9,8 \pm 0,5$ °Brix para leite fermentado e Oliveira; Silva (2021) mostraram teores de sólidos solúveis totais de 21,44 °Brix e 19,4 °Brix para iogurtes gregos. Em relação a condutividade, no estudo de Oliveira; Silva (2021), onde avaliaram-se duas marcas comerciais de iogurtes tradicionais, foram encontrados os valores médios de condutividade elétrica de 144 mS cm^{-1} e 129 mS cm^{-1} . Assim, em relação à formulação controle e contendo extrato de bagaço de uva, foi possível observar valores mais elevados, de 300 a 550 mS cm^{-1} , do que os autores mencionados e havendo variação significativa após 28 dias de armazenamento a 35 °C.

Na Figura 16 e na Figura 17, pode-se observar o comportamento de CF e AM, respectivamente, durante o período de armazenamento das formulações.

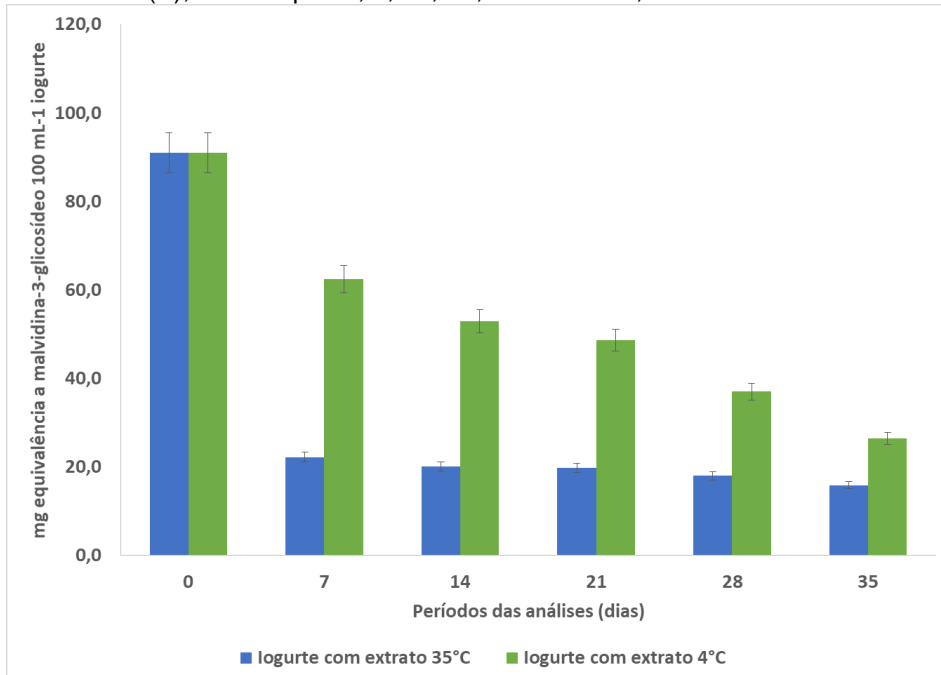
Figura 16 - Comportamento da estabilidade de compostos para as amostras iogurte controle negativo (C-) e iogurte com extrato (E), nos tempos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias, sob armazenamento de 4 e 35°C.



Legenda: Os resultados são demonstrados como média \pm desvio padrão (n = 3). Resultados para compostos fenólicos totais expressos em mg equivalente a ácido gálico 100 mL⁻¹ de iogurte.

Fonte: Autor (2023)

Figura 17 - Comportamento da estabilidade de antocianinas monoméricas para as amostras de iogurte com extrato (E), nos tempos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias, sob armazenamento de 4 e 35°C.



Legenda: Os resultados são demonstrados como média \pm desvio padrão (n = 3). Resultados para antocianinas expressa em mg equivalente a malvidina-3-glicosídeo 100 mL⁻¹ de iogurte.

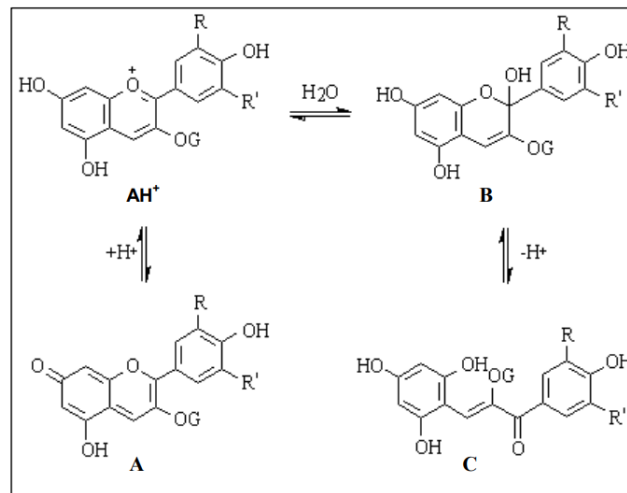
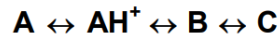
Fonte: Autor (2023)

É possível observar inicialmente, que o teor de compostos fenólicos decaiu ao longo do estudo de estabilidade, em todas as formulações, sendo que na formulação controle negativo, houve redução de 38,746 % para a condição armazenada a 35 °C e de 51,096 % para a condição armazenada a 4 °C. Já para a formulação com o extrato, houve redução de 32,369 % e 14,046 %, para a condição 35 °C e 4 °C, respectivamente. Isso corrobora com o estudo de Citta *et al.* (2017), que determinaram compostos fenólicos totais em iogurtes naturais sem (manteve-se em 20 mg eq EAG 100 mL⁻¹ de iogurte) e com purê de frutas (manteve-se em 27 mg eq EAG 100 mL⁻¹ de iogurte) e desnatados sem (manteve-se em 23 mg eq EAG 100 mL⁻¹ de iogurte) e com purê de frutas (decaiu de 33 para 27 mg eq EAG 100 mL⁻¹ de iogurte), onde durante o prazo de validade, os produtos não foram significativamente alterados em relação ao teor de CF, principalmente se armazenados sob refrigeração. Portanto, o uso do extrato de bagaço de uva na formulação tipo iogurte minimizou a redução do teor de compostos fenólicos na formulação de iogurte.

No caso das antocianinas, para a formulação controle, observou-se valores insignificantes e que são passíveis de intervenção visual devido a turbidez da amostra e foram considerados iguais a zero. Já para a formulação contendo o extrato de bagaço de uva, foi possível obter resultados satisfatórios, onde para a amostra armazenada a 4 °C houve uma redução de 70,930 % e para a amostra armazenada a 35 °C houve redução de 82,558 %. No estudo de Laudeauzer *et al.* (2017), que elaboraram iogurtes com polpa de morango e com corante natural da casca de jaboticaba, que contém antocianinas, foi apresentado perdas percentuais de 19,68 % e 20,35 % após 21 dias sob refrigeração. Assim, pode verificar-se uma perda considerável de antocianinas, de forma mais acentuada na temperatura de 35 °C.

Com isso, foi possível avaliar uma diferença na coloração da amostra no armazenamento da temperatura 35 °C, o que corrobora com o fato da redução do teor de antocianinas influenciada pela temperatura de armazenamento. O mecanismo de destruição das antocianinas pelo calor tende a ser devido à quebra do anel heterocíclico da pseudo base com formação da chalcona. Conforme a Figura 18, as reações de equilíbrio entre as estruturas das antocianinas são endotérmicas, indo da esquerda para a direita. Assim, o aumento da temperatura irá favorecer a formação da chalcona e a ruptura do anel (Constant, 2003).

Figura 18 - Reação de formação estrutural das antocianinas.



Fonte: (Constant, 2003)

Já em relação a estabilidade microbiológica, conforme a Instrução Normativa N° 60, de 23 de dezembro de 2019 para Leite de coco e bebidas à base de cereais, sementes ou grãos estáveis à temperatura ambiente, adicionados de conservadores, informa que para *Enterobacteriaceae* permite-se no máximo 10^2 UFC mL⁻¹.

No estudo de estabilidade do alimento tipo iogurte, assim, como no estudo com o extrato, foi possível verificar que não houve contaminação ou crescimento de coliformes totais e coliformes termotolerantes na amostra (< 3 NMP mL⁻¹) durante o período de armazenamento. Com isso, ressalta-se a importância das boas práticas de fabricação no preparo de produtos alimentícios, a fim de garantir a segurança dos consumidores com a manutenção de níveis aceitáveis de microrganismos nestes.

Em relação a análise visual, para a formulação controle foi possível avaliar, no tempo 35 dias sob armazenamento a 35 °C, uma leve separação de fases e diminuição da viscosidade. Da mesma forma, este processo foi observado para a formulação contendo extrato do bagaço de uva a 35 °C, que apresentou leve diminuição da viscosidade e diminuição da coloração rosa (Tabela 13).

Tabela 13 - Análise visual das formulações do controle do produto alimentício tipo iogurte e do produto alimentício adicionado com o extrato líquido concentrado nas condições de armazenamento de 4 °C e 35 °C, nos tempos zero e 35 dias.

| Características | Formulação | Temperatura ambiente | Temperatura 4 °C | Temperatura 35 °C |
|-----------------|--|--------------------------------|--------------------------------|---|
| | | Tempo zero | Tempo 35 dias | |
| Cor | Iogurte Controle | Branco levemente amarelado | Branco levemente amarelado | Branco levemente amarelado |
| Odor | | Característico de tutti-frutti | Característico de tutti-frutti | Característico de tutti-frutti |
| Aspecto | | Visualmente viscoso | Visualmente viscoso | Aparência líquida/perda de viscosidade/aspecto talhado/separação de fases |
| Cor | Iogurte com extrato líquido concentrado de bagaço de uva | Rosa | Rosa | Rosa claro/perda de coloração |
| Odor | | Característico de tutti-frutti | Característico de tutti-frutti | Característico de tutti-frutti |
| Aspecto | | Visualmente viscoso | Visualmente viscoso | Visualmente teve uma leve redução da viscosidade/separação de fases |

Fonte: Autor (2023)

A diminuição da coloração rosa no produto está de acordo com a redução do teor de antocianinas. Portanto, a temperatura de 35 °C causou redução do teor de antocianinas que impactou na coloração do produto.

Portanto, visto os resultados obtidos após 35 dias de armazenamento do produto alimentício tipo iogurte, verificou-se que o mesmo permaneceu dentro dos parâmetros mínimos de qualidade, mostrando que o extrato de bagaço de uva Bordô é um adjuvante adequado para conservação e manutenção da atividade antioxidante, atividade conservante e das características físico-químicas, podendo ser usado de forma consciente pela indústria alimentícia, após estudos mais aprofundados.

6 CONCLUSÃO

Com base no avaliado neste estudo, foi possível otimizar o processo de extração de compostos fenólicos do bagaço da uva Bordô (*Vitis labrusca*) utilizando sistema de ponteira ultrassônica, com uso de solventes menos agressivos a natureza e tempos menos onerosos de processo.

Para as respostas avaliadas no planejamento experimental (quantidade de compostos fenólicos e teor de antocianinas monoméricas), a extração mais eficiente ocorreu em baixas relações sólido/líquido, alta potência ultrassônica e concentrações crescentes de ácido.

Devido ser fonte de compostos fenólicos e antocianinas, o extrato do bagaço da uva Bordô (*Vitis labrusca*) otimizado, demonstrou ser fonte natural de atividade antioxidante e conservante.

O extrato líquido concentrado demonstrou estabilidade adequada visto manter suas características antioxidantes e antimicrobianas, além de preservar seu composto resveratrol por um período aceitável, sendo este composto conhecido pelas suas propriedades benéficas a saúde.

O extrato líquido concentrado é fonte de compostos fenólicos e foi aplicado em um produto alimentício, o qual demonstrou estabilidade satisfatória, fomentando seu valor nutricional e econômico, podendo ser utilizado como substituto em formulações que utilizam adjuvantes químicos e agressivos a saúde.

REFERÊNCIAS

- ABE, L. T. *et al.* Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Food Science and Technology**, v. 27, p. 394-400, 2007.
- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.
- ALLEN JR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- AMADO, D. A. V. *et al.* Antioxidant and antibacterial activity and preliminary toxicity analysis of four varieties of avocado (*Persea americana* Mill.). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, 2019.
- ANASTASIADI, M. *et al.* Antilisterial activities of polyphenol-rich extracts of grapes and vinification byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 457-463, 2009.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.
- ANTOLOVICH, M. *et al.* Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, n. 1, p. 183-198, 2002.
- APLEVICZ, K. S.; OGLIARI, P. J.; SANT'ANNA, E. S.. Influence of fermentation time on characteristics of sourdough bread. **Brazilian journal of pharmaceutical sciences**, v. 49, p. 233-239, 2013.
- ARAUJO, E. J. S. DE; MOREIRA, J. DE J. S.; CARNELOSSI, M. A. G. Abordagem sobre a utilização de resíduos agroindustriais na estabilidade oxidativa de produtos cárneos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 91932-91942, 2020.
- ASPÉ, E.; FERNÁNDEZ, K. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark. **Industrial crops and products**, v. 34, n. 1, p. 838-844, 2011.
- BAILEY, A. E.; Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 5th ed., **John Wiley**: New York, 1996, vol. 3.
- 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.
- BARBA, F. J. *et al.* Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 49, p. 96-109, 2016.
- BENDICHO, C. *et al.* Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 31, p. 50-60, 2012.
- BENZIE, I. F.; STRAIN J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

- BERES, C. *et al.* Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. **Waste Management**, v. 68, p. 581–594, 2017.
- BERNARDO, C. O.; ASCHERI, J. L. R.; CARVALHO, C. W. P. DE. Efeito do ultrassom na extração e modificação de amidos. **Ciência Rural**, v. 46, p. 739–746, abr. 2016.
- BERTOLIN, T. E. *et al.* Ficocianina, tocoferol e ácido ascórbico na prevenção da oxidação lipídica em charque. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, p. 301-307, 2011.
- BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology & therapeutics**, v. 90, n. 2-3, p. 157-177, 2001.
- BISBAL, J. J. S. *et al.* Especies vegetales como antioxidantes de alimentos. **Nereis**, n. 12, p. 71-90, 2020.
- BOBBIO, F. O; BOBBIO, P.A. Florinda Orsatti. Química do processamento de alimentos. In: **Química do processamento de alimentos**. 1995. 478 p.
- BONETTI, F.; BROMBO, G.; ZULIANI, G. Nootropics, functional foods, and dietary patterns for prevention of cognitive decline. In: **Nutrition and functional foods for healthy aging**. Academic Press, 2017. p. 211-232.
- BORDIGNON JR., C. L. *et al.* Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Food Science and Technology**, v. 29, p. 183-188, 2009.
- BOROSKI, M. *et al.* Antioxidantes: princípios e métodos analíticos. **Curitiba: Appris**, v. 141, 2015.
- BRASIL. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos (Instrução normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, n. 249, 2019.
- BRASIL. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos (Instrução normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, n. 249, 2019.
- BRASIL. Guia N. 16/2018 – Versão 1. Guia para determinação de prazos de validade de alimentos. 2018.
- BRASIL. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. (Instrução Normativa Nº46, de 24 de outubro de 2007). Brasília, 2007. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 2007.
- BRITO, F. M. L. DE. Resveratrol e suas implicações para a saúde. 2016.
- BUENO, J. M. *et al.* Analysis and antioxidant capacity of anthocyanin pigments. Part II: Chemical structure, color, and intake of anthocyanins. **Critical reviews in analytical chemistry**, v. 42, n. 2, p. 126-151, 2012.
- CAMARGO, U. A. **Cultivares**. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/uva_para_processamento/arvore/CO NT000g5f8cou802wx5ok0bb4szwyx060i6.html>. Acesso em: 17/02/2023.
- CAMARGO, U. A. *et al.* Progressos na viticultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 144–149, out. 2011.

- CARDOSO, T. *et al.* Potential food application of resveratrol microparticles: Characterization and controlled release studies. **Powder Technology**, v. 355, p. 593–601, 2019.
- CELESTINO, I. C. **Vida-de-prateleira acelerada e bioativos em polpa de Passiflora setacea pasteurizada**. 2019. 80 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) — Universidade de Brasília, Brasília, 2019.
- CERON, I.; HIGUITA, J.; CARDONA, C. Capacidad antioxidante y contenido fenólico total de tres frutas cultivadas en la región andina. **Vector**, v. 5, n. 2011, p. 5, 2010.
- CHEABURU-YILMAZ, C. N.; KARASULU, H. Y.; YILMAZ, O. Nanoscaled dispersed systems used in drug-delivery applications. **Polymeric nanomaterials in nanotherapeutics**, p. 437-468, 2019.
- CHEMAT, F. *et al.* Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. **A review**. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 34, p. 540–560, 2017.
- CHEN, W. K. *et al.* Flavonoid and aromatic profiles of two *Vitis vinifera* L. teinturier grape cultivars. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 24, n. 3, p. 379–389, 2018.
- CITTA, A. *et al.* Oxidative changes in lipids, proteins, and antioxidants in yogurt during the shelf life. **Food Science & Nutrition**, v. 5, n. 6, p. 1079–1087, 2017.
- Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: **Approved standard (9th ed.)**. **Wayne: CLSI. CLSI document M07-A9**, 2012.
- CRAVOTTO, G.; CINTAS, P. Power ultrasound in organic synthesis: moving cavitation chemistry from academia to innovative and large-scale applications. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 2, p. 180-196, 2006.
- CRUZ, R. G. **Atividade antioxidante de extratos vegetais: estudo das condições de extração e aplicação em sistema lipídico**. 2014. 97 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.
- CZAMANSKI, R. T. **Prospecção de atividade antibacteriana em resíduos da viticultura na perspectiva da desinfecção e antissepsia aplicadas a saúde e a produção animal, bem como a agroindústria familiar**. Tese (Doutorado em Ciências veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
- D'ARCHIVIO, M. *et al.* Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita**, v. 43, n. 4, p. 348–361, 2007.
- DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 15, n. 10, p. 7313–7352, 21 out. 2010.
- DALBÓ *et al.* Produtividade e qualidade de uvas da cv. Isabel (*Vitis labrusca* L.) submetidas à adubação potássica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, p. 789-796, 2015.
- DAS, A. B.; GOUD, V. V.; DAS, C. Phenolic compounds as functional ingredients in beverages. In: **Value-added ingredients and enrichments of beverages**. Academic Press, 2019. p. 285-323.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, 2004.

DELISO, C. *et al.* Processamento PEF em duas etapas para aumentar a concentração de polifenóis e descontaminar um suco de uva vermelha. **Alimentos**, v. 11, n. 4, pág. 621, 2022.

DIAS, S.P.; MENEGON, R.F. Comparação do teor de fenólicos totais e da ação antioxidante e sucos industrializados de uva e de vinhos tinto. **Revista Univap**, p. 68–76, 2012.

DREVELEGKA, I.; GOULA, A. Recovery of grape pomace phenolic compounds through optimized extraction and adsorption processes. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 149, p. 107845, 1 fev. 2020.

ENARU, B. *et al.* Anthocyanins: Factors Affecting Their Stability and Degradation. **Antioxidants**, v. 10, n. 12, p. 1967, dez. 2021.

FENG, J. *et al.* Comparative study of phenolic compounds reveals a positive relationship between astringency and the phenolic composition in table grape varieties. **Journal of Food Science**, v. 88, n. 1, p. 447–461, 2023.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61–68, mar. 1997.

FERREIRA, M. M. M.; OLIVEIRA, A. H. C. DE; SANTOS, N. S. Flavonas e flavonóis: novas descobertas sobre sua estrutura química e função biológica. **Agro@ambiente On-line**, 2008.

FILHO, D. B. F.; JUNIOR, J. A. S. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**, v. 18, n. 1, 2009.

FLAMINI, R. *et al.* Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: Anthocyanins, stilbenes and flavonols. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 10, p. 19651–19669, 2013.

FREIRE, G. A. S. *et al.* Teor de antocianinas, cor, textura, características físico-químicas e microbiológicas de leite fermentado adicionado de extrato rico em antocianinas obtido a partir de uvas tintas. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 56192-56205, 2020.

FREITAS, C. T. M. *et al.* Avaliação do perfil de potenciais consumidores de produtos veganos. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 28036–28044, 18 mar. 2021.

FREITAS, E. R. *et al.* Extratos etanólicos da manga como antioxidantes para frangos de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 1025–1030, ago. 2012.

FUTIGAMI, L. S. **Aproveitamento dos resíduos do processo de vinificação para obtenção de corante natural de antocianinas com potencial aplicação em alimentos**. Revisão bibliográfica. 2021. 57 p.

GARCÍA, Y. R. **Obtenção de um extrato concentrado a partir da casca de uva cv. Alicante bouschet (*Vitis vinifera* L.): caracterização química, bioacessibilidade e aplicação como corante**. 106 f. 2019.

GIUSTI, M.M., WORSLTAD, R.E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy: Current Protocols in Food Analytical Chemistry. **John Wiley**, New York, NY, USA. 2001.

GONZÁLEZ-CENTENO, M. R. *et al.* Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 506–514, 2015.

GRIGORAS, C. G. *et al.* Sweet cherries anthocyanins: an environmental friendly extraction and purification method. **Separation and Purification Technology**, v. 100, p. 51–58, 2012.

GRIZOTTO, R. K. *et al.* Estudo da vida-de-prateleira de fruta estruturada e desidratada obtida de polpa concentrada de mamão. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 3, p. 709-714, 2006.

GUERRA, C. C. Influência de parâmetros enológicos da maceração na vinificação em tinto sobre a evolução da cor e a qualidade do vinho. In: **Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia–Influência da Tecnologia Vitícola e Vinícola na Cor dos Vinhos**. 2003.

GUERRA, *et al.* **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 64 p., 2009.

HRAZDINA, G.; BORZELL, A. J.; ROBINSON, W. B. Studies on the stability of the anthocyanidin-3, 5-digucosides. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 21, n. 4, p. 201-204, 1970.

IACOBUCCI, G. A.; SWEENEY, J. G. The chemistry of anthocyanins, anthocyanidins and related flavylum salts. **Tetrahedron**, v. 39, n. 19, p. 3005-3038, 1983.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3 ed., São Paulo; Instituto Adolfo Lutz, v.1, 1985, 533 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola - Lavoura Permanente**. 2022. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/15/0?indicador=12067>>. Acessado em: 17 set. 2023.

JEANDET, P. *et al.* Metabolic engineering of yeast and plants for the production of the biologically active hydroxystilbene, resveratrol. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012.

JEANDET, P. *et al.* Phytoalexins from the *itaceae*: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. **Journal of agricultural and Food Chemistry**. v.50, n.10, p.2731-2741, 2002.

KAMMERER, D. *et al.* Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 14, p. 4360–4367, 2004.

KEBEDE, M.; EMIRE, S. Application of antioxidants in food processing industry: Options to improve the extraction yields and market value of natural products. **Adv. Food Technol. Nutr. Sci**, v. 5, p. 38-49, 2019

KHADHRAOUI, B. *et al.* Review of ultrasound combinations with hybrid and innovative techniques for extraction and processing of food and natural products. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 76, p. 105625, 2021.

KOCABEY, N.; YILMAZTEKIN, M.; HAYALOGLU, A. A. Effect of maceration duration on physicochemical characteristics, organic acid, phenolic compounds and antioxidant activity of red wine from *Vitis vinifera* L. Karaoglan. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 9, p. 3557–3565, 2016.

LANGE, M. K.; HEBERLÉ, G.; MILÃO, D. Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de uma emulsão base não-iônica contendo resveratrol. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 145–151, 2009.

LAUDEAUZER, C. M. *et al.* Avaliação da estabilidade de antocianinas em iogurte elaborado a partir de corante natural obtido da casca de jabuticaba. In: Anais do Simpósio Latino Americano de Ciência dos Alimentos, 2017, Campinas. **Anais eletrônicos...** Campinas, 2017. Disponível em: <<https://proceedings.science/slaca/slaca-2017/papers/avaliacao-da-estabilidade-de-antocianinas-em-iogurte-elaborado-a-partir-de-coran?lang=pt-br>>. Acesso em: 17 set. 2023.

LEAL, C. *et al.* Potential application of grape (*Vitis vinifera* L.) stem extracts in the cosmetic and pharmaceutical industries: Valorization of a by-product. **Industrial Crops and Products**, v. 154, p. 112675, 2020.

LEAL, J. B. *et al.* Resveratrol: composição química e seus benefícios à saúde. **RBONE - Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 11, n. 67, p. 620–629, 2017.

LEE, S. K.; KADER, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, n. 3, p. 207–220, 2000.

LIMA, F. O.; BEZERRA, A. S. Flavonoides e radicais livres. **Disciplinarum Scientia - Naturais e Tecnológicas**, v. 13, n. 1, p. 111–124, 2012.

LIMA, G. C.G; COMARELLA, L. Sugestão de desenvolvimento de formulações de xampu-sabonete auxiliar no tratamento da dermatite seborréica. **Revista Uniandrade**, v. 13, n. 2, p. 160 – 174, 2011.

LINHARES, M. S. S. **Corante antociânico extraído de resíduos da indústria de vinho tinto e suco integral de uva: caracterização e estabilidade**. São Cristóvão, SE, 2020. 89 f.

LOPES, R.M. *et al.* Flavonóides: farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **Biociência**, 2010; 3(17):18-22.

LUQUE-GARCÍA, J. L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41–47, 2003.

MACHADO, H. *et al.* Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. 1/2, 2008.

MAGALHÃES, B. *et al.* Ocorrência e significado da cumarina na cachaça armazenada em amburana. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 1, 2023.

- MAKARA, C. N. **Extração e caracterização de compostos bioativos presentes no bagaço de uva**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- Mani-Lopez, E. *et al.* Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. **Food Research International**, 45: p. 713-721. 2012.
- MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, p. 1218–1223, 2008.
- MARTELLI, E. C. *et al.* Uso de substâncias bioativas como conservantes naturais em formas farmacêuticas: uma revisão. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 2, p. 8120–8133, 2021.
- MARTIN, J. G. P. *et al.* Antimicrobial potential and chemical composition of agro-industrial wastes. **Journal of Natural Products**. v. 5, p. 27-36, 2012.
- MARTINELLI, M. *et al.* Avaliação Sensorial e da Qualidade de Uvas-Passas Processadas a Partir de Três Cultivares Produzidas No Semiárido. **Braz. J. Food Technol.** 2018, 21, e2017131.
- MAZZA, K. E. L. **Extração assistida por ultrassom e microencapsulação por spray drying de compostos fenólicos do bagaço de uva**. Rio de Janeiro, 2017. 118 f.
- MEDEIROS, R. A. B. **Influência da extração assistida por ultrassom e impregnação de compostos fenólicos de resíduo de uva na produção de manga desidratada**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2021.
- MELLO, L. M. R.; MACHADO, C. A. E. **Vitivinicultura brasileira: panorama 2019**. Comunicado técnico 214, Bento Gonçalves. 2020.
- MENG, J. F. *et al.* Varietal differences among the phenolic profiles and antioxidant properties of four cultivars of spine grape (*Vitis davidii* Foex) in Chongyi County (China). **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 2049–2056, 15 out. 2012.
- MIRANDA, J. A. DE. **Caracterização fotofísica de derivados de Cumarinas**. 2001. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/27195/1/Caracteriza%C3%A7%C3%A3oFotof%C3%ADsicaDerivados.pdf>>. Acesso em: 17 set. 2023.
- MOHAMMAD, S. S. **Separação e purificação de compostos de antocianina a partir do resíduo da fermentação de casca da uva variedade Alicante Bouschet utilizando resinas macroporosas**. 2019.
- MONRAD, J. K. *et al.* Subcritical solvent extraction of procyanidins from dried red grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 4014–4021, 2010.
- MORGADO, J. R. **Estudo da estabilidade oxidativa e da cinética de oxidação lipídica do óleo de café verde por diferentes vias**. 2022.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, Food Science. v. 1054, n. 1, p. 95–111, 2004.
- NEVES, L. F. D. **Fatores de influência na intenção de compra de produtos veganos: Estudo comparativo do comportamento do consumidor português e**

brasileiro. Tese (Doutorado) - Curso de Economia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2018.

NICHOLLS, KELLY. Illawarra Mercury, Sailor's course one of success – Birds an inspiration, (MANDELA quote): Kelly Nicholls Quote Page 17, Wollongong, Australia. (NewsBank Access World News). 2001 April 21

NINH THE, S.; DO MINH, T.; NGUYEN VAN, T. Isoflavones and Isoflavone Glycosides: Structural-Electronic Properties and Antioxidant Relations—A Case of DFT Study. **Journal of Chemistry**, v. 2019, p. e4360175, 2019.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M.AB; SPOTO, M.H.F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri, SP: Manole, 2006, 612 p.

OLIVERA, E. R. S. M.; SILVA, M. G. F. C. **logurte vegetal como alternativa de alimentação saudável para veganos: uma revisão bibliográfica**. 2021.

PEREIRA, A. M. D. *et al.* Estudo fitoquímico e atividade biológica de *Vitis vinífera*: uma revisão de literatura. **E-Acadêmica**, v. 3, n. 3, p. e5633364–e5633364, 5 dez. 2022.

PEREIRA, B.B. Aditivos alimentares: conceitos, aplicações e toxicidade. Monte Carmelo, MG: **Editora FUCAMP**, 2013.

PEREIRA, G. E. *et al.* **Vinhos no Brasil: contrastes na geografia e no manejo das videiras nas três viticulturas do país**. 2020.

PEREIRA, T. A. **Avaliação da eficácia de um sistema conservante em formulações adicionadas de biomoléculas farmacêuticas e estudos de adaptação microbiana**. 2011.

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário**. p. 26, Disponível em: <<http://www2.ufpel.edu.br/biotecnologia/gbiotec/site/content/paginadoprofessor/uploadsprofessor/ce5449dfcf0e02f741a5af86c3c5ae9a.pdf?PHPSESSID=e32d8df36f08f86ef80010a253f33762>>. Acesso em: 17 set. 2023.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, n. 7, p. 791–800, 2006.

PONTES, P. V. DE A. **Estudo dos compostos fenólicos, potencial antioxidante e perfil dos ácidos graxos presentes em bagaço de uva da variedade Cabernet Sauvignon**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

PRISTA, L. N., ALVES, A. C., MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 2008.

PUERTO RODRÍGUEZ, F. **Relación entre los estilbenos y el estado oxidativo**. 2019.

RADULESCU, C. *et al.* Phytochemical Profiles, Antioxidant and Antibacterial Activities of Grape (*Vitis vinifera* L.) Seeds and Skin from Organic and Conventional Vineyards. **Plants**, v. 9, n. 11, p. 1470, 2020.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. **Química Nova**, v. 29, p. 755–760, 2006.

- RE, R., *et al.* Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, 1999, 26(9-10), 1231-1237.
- RIBEIRO, T. P. *et al.* Caracterização Química de Subprodutos da Vinificação de Castas Cultivadas no Vale do São Francisco, Brasil. **Ciência Alimentar. Tecnol.** 2018, 38 577–583.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933–956, 1996.
- RITSCHHEL, P. **As novas cultivares brasileiras para elaboração de suco de uva.** 2013. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1354377/1743462/novas-cultivares-brasileiras-de-uva-Patricia-Ritsche.pdf/aa6a44ac-c07f-440d-a10a-7eb751392602?version=1.0>>. Acesso em: 17 set. 2023.
- RIZZON, L. A. **Metodologia para análise de vinho.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Uva e Vinho. Bento Gonçalves, 2006.
- RIZZON, L. A.; MIELE, A.; MENEGUZZO, J. Avaliação da uva cv. Bordô para a elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 115-121, 2000.
- ROCKENBACH, I. I. *et al.* Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 897–901, 2011.
- ROSTAGNO, M. A.; PRADO, J. M. Natural Product Extraction: Principles and Applications. **RSC PUBLISHING**, Cambridge, UK, 2013.
- ROTAVA, R. *et al.* Atividade antibacteriana, antioxidante e tanante de subprodutos da uva. **Ciência Rural**, v. 39, p. 941–944, 2013.
- RUBY, M. B. Vegetarianism. A blossoming field of study. **Appetite**, v. 58, n. 1, p. 141–150, 2012.
- SAIGO, T. *et al.* Diversity of anthocyanin and proanthocyanin biosynthesis in land plants. **Current Opinion in Plant Biology**, Physiology and Metabolism. v. 55, p. 93–99, 2020.
- SANTOS, D. S. DOS; RODRIGUES, M. M. F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 3, p. 29–35, 2017.
- SANTOS, R. K. S. **Utilização de água subcrítica e métodos convencionais de extração para a valorização de resíduos do processamento de graviola (*Annona muricata*).** Recife, 2018. 86 folhas. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
- SANTOS, W. Capacidade antioxidante e conteúdo fenólico de infusões e decocções de ervas medicinais. **Produtos Naturais e Suas Aplicações: da comunidade para o laboratório.** p. 234–247. 2021.
- SARAIVA, M. C. **Expectativa de consumo baseado na aparência de sorvete vegano elaborado a partir do extrato hidrossolúvel da amêndoa da castanha de caju.** 2021.

- SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. **Natural Products Isolation**. 2ª Ed., p. 529, Human Press, 2005.
- SCHAICH, K. M. Lipid oxidation: theoretical aspects. **Bailey's industrial oil and fat products**, v. 1, n. Part 7, p. 273-303, 2005.
- SCHNEIDER, C. C.; **Utilização de Ultrassom em Química Orgânica**. Monografia do curso de Bacharelado e Licenciatura em Química, Universidade Federal de Pelotas, 2005.
- SILVA, C. DA; GARCIA, V. S.; FRANCISCATO, L. S. Extração assistida por ultrassom de compostos bioativos das cascas de lichia (*Litchi chinensis* Sonn.). **RECEN - Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 18, n. 1, p. 81–96, 2016.
- SILVA, E. M. DA *et al.* Prospecção no Âmbito da Produção de Antioxidantes Naturais para Inserção no Mercado Alimentício. **Cadernos de Prospecção**, v. 15, n. 1, p. 245–260, 2022.
- SILVA, M. L. C. *et al.* Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, vol. 31, núm. 3, 2010, pp. 669-681. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, Brasil.
- SILVA, N. da. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. São Paulo: **Blucher**, 2017.
- SILVA, R. S. DA *et al.* Otimização da extração assistida por ultrassom de compostos bioativos da espécie *Caryocar brasiliense*. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e41310916493–e41310916493, 2021.
- SINGLETON, V. L., & ROSSI JR, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, 1965, 16(1), 144-158.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71–81, 2002.
- SOUZA, V. B. **Aproveitamento dos subprodutos de vinificação da uva Bordô (*Vitis labrusca*) para obtenção de pigmentos com propriedades funcionais**. 2013. 122 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.
- SUSLICK, S. *et al.* Acoustic Cavitation and Its Chemical Consequences. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 357, 2000.
- TAIZ, Lincoln, *et al.* Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal - 6ed. Brasil, Artmed Editora, 2016.
- TAVARES, H. M. **Estudo da concentração do suco de uva por osmose direta e evaporação térmica**. 2021.
- TEIXEIRA, B. A. **Otimização da extração assistida por ultrassom de antocianinas e fenólicos totais d frutas vermelhas produzidas no Brasil**. Viçosa, MG, 2018. Xi, 45 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.
- TERCI, D. B. L.; ROSSI, A. V. Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução? **Química Nova**, v. 25, p. 684–688, 2002.

- TERCI, D.B.L. **Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas todas as frutas.** Tese de Doutorado; Instituto de Química – UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2004.
- TOLEDO, M C F; ESTEVES, W; HARTMANN, E M. Eficiência de antioxidantes em óleo de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 1985.
- TORRES, J. L.; BOBET, R. New flavanol derivatives from grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant aminoethylthio-flavan-3-ol conjugates from a polymeric waste fraction used as a source of flavanols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4627–4634, 2001.
- TOURNAS, V. *et al.* Yeasts, molds and mycotoxins. In: **Bacteriological Analytical Manual Online**. 2001.
- TRIGUEIRO, A. Consumo, ética e natureza: o veganismo e as interfaces de uma política de vida. **Revista Internacional Interdisciplinar INTERTHESES**, v.10 n.1, p.237–260, 2013.
- VALDUGA, E. *et al.* Extraction, spray drying and microencapsulating of “Isabel” grape (*Vitis labrusca*) bagasse anthocyanin. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 5, p. 1568–1574, out. 2008.
- VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.
- VERDE, R. O.; RIBEIRO, C. S.; OLIVEIRA, E.E.G.N.; ALMEIDA, B.P. Os benefícios da dieta vegetariana em atletas. **Revista ENAF Science**. 2014; 9 (1) 125-38.
- VIZZOTO, M. *et al.* **Metabólitos Secundários encontrados em plantas e sua importância.** Disponível em:
<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/886074/1/documento316.pdf>>
. Acesso em 17 set. 2023.
- WEBER, F.; BOCH, K.; SCHIEBER, A. Influence of copigmentation on the stability of spray dried anthocyanins from blackberry. **LWT - Food Science and Technology**, v. C, n. 75, p. 72–77, 2017.
- YOKOZAWA, T.; DONG, E.; LIU, Z.W. & SHIMIZU, M. Antioxidant activity of flavones and flavonols in vitro. 1997. **Phytotherapy Research**. Vol.11:446-450.