



**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**ÁREA DE CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**  
**LABORATÓRIO DE PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS**

PRODUÇÃO DE EXTRATOS ENRIQUECIDOS COM FLAVONOIDES  
A PARTIR DE CO-PRODUTOS DA ELABORAÇÃO DE SUCO DE UVA

**Vânia Pezzini**

Caxias do Sul, 2017

**Vânia Pezzini**

**PRODUÇÃO DE EXTRATOS ENRIQUECIDOS COM FLAVONOIDES  
A PARTIR DE CO-PRODUTOS DA ELABORAÇÃO DE SUCO DE UVA**

Orientador: Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mirian Salvador

Caxias do Sul, 2017

**Vânia Pezzini**

**PRODUÇÃO DE EXTRATOS ENRIQUECIDOS COM FLAVONOIDES  
A PARTIR DE CO-PRODUTOS DA ELABORAÇÃO DE SUCO DE UVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra<sup>a</sup>. Mirian Salvador

Caxias do Sul, 2017

**VÂNIA PEZZINI**

**PRODUÇÃO DE EXTRATOS ENRIQUECIDOS COM FLAVONOIDES A  
PARTIR DE CO-PRODUTOS DA ELABORAÇÃO DE SUCO DE UVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mirian Salvador

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 31 DE JULHO DE 2017.

---

Orientador: Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva

---

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mirian Salvador

---

Prof. Dr. Cláudio Martin Pereira de Pereira

---

Prof. Dr. Otávio Bianchi

---

Prof. Dr. Leandro Tasso

P522p Pezzini, Vânia

Produção de extratos enriquecidos com flavonoides a partir de co-  
produtos da elaboração de suco de uva / Vânia Pezzini. – 2017.  
40 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia, 2017.

Orientação: Sidnei Moura e Silva.

Coorientação: Mirian Salvador.

1. Uva. 2. Vinificação. 3. Co-produto. 4. Extração. 5. Compostos  
fenólicos. I. Silva, Sidnei Moura e, orient. II. Salvador, Mirian, coorient.  
III. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva pela orientação segura e personalizada.

A co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Mirian Salvador pelos ensinamentos, compreensão, dedicação e colaboração.

Ao meu companheiro Michel Larentis por toda dedicação e cumplicidade.

A Vinícola Don Celesto, situada em São Marcos, que cedeu o material deste trabalho.

A Deus pelo dom da vida e que está sempre ao meu lado me ajudando.

A Universidade de Caxias do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade de ter realizado este projeto.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que me incentivaram e que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“A mente que se abre a uma nova ideia  
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

## RESUMO

Com o aumento da população e crescimento da produção industrial, há uma crescente quantidade de resíduos provenientes destas transformações. Neste estudo o foco são os co-produtos do processo de vinificação, conhecidos como bagaço. Anualmente são produzidas no mundo 60 milhões de toneladas de uva, das quais 80% são utilizadas no processo de vinificação, gerando toneladas de co-produtos orgânicos pouco aproveitados. Este é caracterizado por conter altas concentrações de compostos fenólicos, os quais podem ser reaproveitados como antioxidantes. Assim, o principal objetivo deste projeto foi apresentar a influência de diversos métodos de extração sobre a composição química e a atividade antioxidante destes extratos/frações. Para isso foram realizadas extrações por micro-ondas, ultrassom e líquido-líquido, com solventes de polaridades diferentes (etanol, água, metanol, hexano, clorofórmio e acetato de etila). Além disso, o extrato foi fracionado com auxílio de coluna aberta utilizando sílica como fase estacionária e como fase móvel solventes de diferentes polaridades. A caracterização química foi realizada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector UV-Vis (CLAE-UV) e Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR). Entre os principais compostos identificados estão os fenólicos como a rutina, o ácido gálico, a catequina, e alguns carboxilatos como o ácido linoleico e o ácido esteárico. Nas extrações realizadas podemos identificar que o solvente etanol, em todos os métodos de extração, obteve melhores resultados referente a qualificação e quantificação de compostos químicos em análise com CLAE-UV. A avaliação da capacidade antioxidante foi realizada através do método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>\*</sup>). Os dados obtidos por extração micro-ondas mostraram uma maior porcentagem de varredura ( $2,44\% \pm 36,64$ ), quando o solvente utilizado foi o etanol. Na extração por sonografia, os valores mais elevados  $2,07\% \pm 74,22$  foram observados utilizando-se acetato de etila. Na extração líquido-líquido o maior percentual de varredura ( $0,61 \pm 33,62$ ) foi observado para o solvente acetato de etila. Em geral, os extratos obtidos por extração com micro-ondas apresentaram maior teor de compostos fenólicos ( $0,04 \pm 13,18$  a  $6,02\text{mg} \pm 107,03$  GAE/100g). Os resultados obtidos neste projeto indicam que este co-produto pode ser melhor aproveitado para a aplicação como uma fonte de ingredientes funcionais, como suplementos alimentares ou na indústria cosmética, por conterem compostos importantes.

**Palavras-chave:** Uva. Vinificação. Co-produto. Extração. Compostos fenólicos.



## ABSTRACT

With increasing population and industrial production growth, there is an increasing amount of waste coming from these transformations. The focus of this study will be on the co-products of the winemaking process, known as grape marc. Every year 60 million tons of grape are produced, 80% of which are used in the winemaking process, generating tons of underutilized organic co-products. This is characterized by its high concentrations of phenolic compounds which can be reused as antioxidants. Thus, the main goal of this project was to present the influence of different extraction methods on chemical composition and antioxidant activity of these extracts/fractions. For this, the extractions were performed by microwave, ultrasound and liquid-liquid, with different polarities solvents (ethanol, water, methanol, hexane, chloroform and ethyl acetate). Moreover, the extract was fractionated with the aid of an open column using silica as stationary phase and different polarities solvents as mobile phase. The chemical characterization was performed by High Performance Liquid Chromatography with UV-Vis detector (CLAE) and High Resolution Mass Spectrometry (HRMS). Among the main compounds identified are phenolics such as rutin, gallic acid, catechin, and some carboxylates such as linoleic acid and stearic acid. In the extracted extractions we can identify that the ethanol solvent, in all extraction methods, obtained better results regarding the qualification and quantification of chemical compounds in analysis with HPLC-UV. The evaluation of antioxidant capacity was carried out using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH •) method. The data obtained by microwave extraction showed a higher percentage of scanning ( $2,44\% \pm 36,64$ ), when the solvent used was ethanol. In the extraction by sonography, the highest values  $2,07\% \pm 74,22$  were observed using ethyl acetate. In the liquid-liquid extraction the highest percentage of sweep ( $0,61 \pm 33,62$ ) was observed for the solvent ethyl acetate. In general, the extracts obtained by extraction with microwaves presented higher levels of phenolic compounds ( $0,04 \pm 13,18$  a  $6,02\text{mg} \pm 107,03$  GAE/100g). The results obtained in this project indicate that this co-product can be better utilized for the application as a source of functional ingredients, as food supplements or in the cosmetic industry, because they contain important compounds.

**Keywords:** Grape. Winemaking. Co-products. Extraction. Phenolic compounds.

## SUMÁRIO

|              |                                                |           |
|--------------|------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                        | <b>10</b> |
| <b>2</b>     | <b>OBJETIVOS .....</b>                         | <b>12</b> |
| 2.1          | OBJETIVO GERAL.....                            | 12        |
| 2.2          | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                    | 12        |
| <b>3</b>     | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>             | <b>13</b> |
| 3.1          | UVA E VINHO .....                              | 13        |
| 3.2          | INDÚSTRIA VINÍCOLA: PRODUTO E SUBPRODUTO ..... | 14        |
| 3.3          | APLICAÇÕES DE CO-PRODUTOS DA UVA.....          | 19        |
| 3.4          | COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS RESÍDUOS DE UVA.....    | 20        |
| <b>3.4.1</b> | <b>Resveratrol .....</b>                       | <b>21</b> |
| 3.5          | COMPOSTOS FENÓLICOS COMO ANTIOXIDANTES.....    | 22        |
| 3.6          | MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....                       | 22        |
| <b>4</b>     | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>            | <b>26</b> |
| <b>5</b>     | <b>DISCUSSÃO GERAL .....</b>                   | <b>27</b> |
| <b>6</b>     | <b>CONCLUSÕES.....</b>                         | <b>31</b> |
| <b>7</b>     | <b>PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>              | <b>32</b> |
|              | <b>REFERÊNCIAS .....</b>                       | <b>33</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

No último século a população brasileira sextuplicou. Estatísticas do IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2017 informam que no país há cerca de 207 milhões de pessoas. O aumento da população tem demandado uma expansão da indústria. Assim, tem havido um recorrente aumento de resíduos gerados a partir dos processos industriais, os quais precisam ser descartados convenientemente.

Inseridas nesse contexto estão as indústrias vinícolas, que consideram o bagaço como subproduto. Este co-produto, gerado no processo de elaboração de suco de uva, tem atraído a atenção de pesquisadores devido a sua composição química ser baseada em compostos fenólicos, os quais são antioxidantes naturais. A produção de uvas para processamento vinícola ocupa uma área de aproximadamente 83.700 hectares no Brasil, sendo mais proeminente na região da Serra Gaúcha (IBGE, 2016). Portanto, trata-se de uma importante atividade agrícola e econômica, principalmente nesta região (BARBA et al., 2016). Anualmente são produzidos quase 20 milhões de toneladas de resíduos de vinificação que são descartados, muitas vezes, de forma inadequada causando um problema ambiental grave.

Durante o processo de vinificação são gerados resíduos como: engaço, casca e sementes. Estes co-produtos são, muitas vezes, descartados ou utilizados como condicionadores do solo. Por outro lado, possuem uma composição química rica em compostos valiosos. Entre as substâncias presentes estão catequinas, flavonóis, glicosídeos, álcoois e ácidos fenólicos, estilbenos e antocianinas (KAMMERER et al., 2005).

Entre os compostos originados do metabolismo secundário da planta sobressaem os compostos fenólicos, os quais são substâncias com, ao menos, um anel aromático ligado a uma hidroxila. São encontrados em frutas, verduras, sementes, bem como em chás, vinhos, sucos e outras fontes de alimentos consumidos regularmente na dieta humana, destacando-se as uvas que são particularmente ricas em polifenóis bioativos, especialmente os flavonoides.

Neste contexto, há um crescente interesse pela utilização de co-produtos de vinificação por possuírem propriedades antioxidantes decorrentes da presença de compostos fenólicos da uva. Assim sendo, o intuito desta pesquisa é avaliar diferentes métodos de extração com intenção de produzir extratos enriquecidos em compostos fenólicos a partir de co-produtos da elaboração de suco de uva. Entre os métodos de extração foram utilizados: micro-ondas, ultrassom, líquido-líquido. Além disso, o extrato foi fracionado com auxílio de coluna aberta utilizando sílica como fase estacionária e como fase móvel solventes de diferentes polaridades. Para complementar o estudo foram feitas caracterizações químicas dos extratos

e/ou frações obtidas através de diferentes métodos analíticos (CLAE-UV e EMAR). A capacidade antioxidante foi determinada pelo método de DPPH, e a quantidade de compostos fenólicos totais foi avaliada pelo método de Folin-Ciocalteu.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar diferentes métodos de extração com intenção de produzir extratos enriquecidos em compostos fenólicos a partir de co-produtos da elaboração de suco de uva.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Comparar os métodos de extração por ultrassom, micro-ondas e líquido-líquido para separar compostos com atividades antioxidantes a partir de resíduos da elaboração de suco de uva.
- Avaliar e quantificar a composição química dos extratos obtidos através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector UV-VIS (CLAE-UV) e Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR).
- Determinar a quantidade de fenólicos totais através do método Folin-Ciocalteu.
- Determinar a capacidade antioxidante através do método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

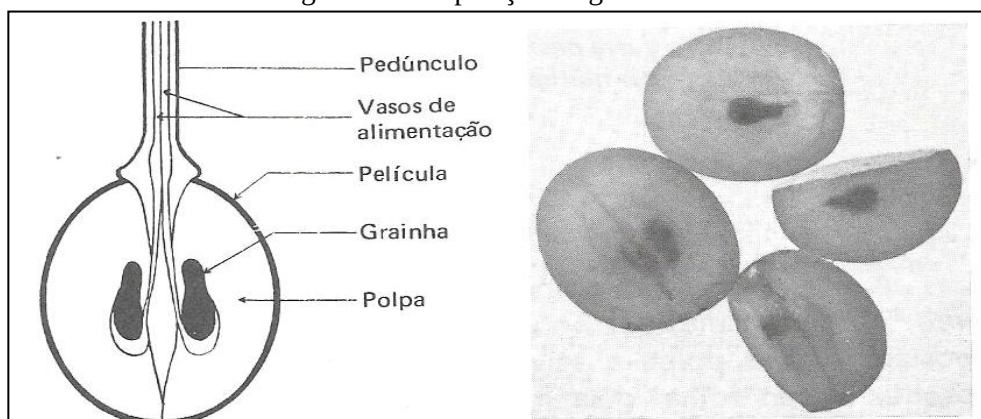
#### 3.1 UVA E VINHO

Na antiguidade, era considerada uma arte a transformação de uva em vinho. Na atualidade continua sendo considerada uma arte a vinificação, no entanto, com uma preocupação maior com os valores sensoriais e funcionais da bebida (FERNANDES, 2008). É vasta a literatura que disserta sobre a parreira, a uva e o vinho esclarecendo que há muitas variedades de uvas, sendo que a maioria delas pertence às classes *Vitis viníferas*. Aqui cabe destacar as informações apresentadas por Zhu et al. (2014) que indicam ser a uva uma das frutas mais cultivadas no mundo, principalmente em continentes de climas temperados. As estatísticas do IBRAVIN (2016) – Instituto Brasileiro do Vinho – indicam que, anualmente, são produzidas 60 milhões de toneladas de uvas no Brasil, dos quais 80% são utilizadas na produção de vinhos, sucos e derivados. As primeiras espécies de videiras, vindas de Portugal, foram introduzidas no Brasil por Martim Afonso Souza no ano 1531-1532.

A uva é o fruto da videira, gênero *Vitis*. Entre as espécies destacam-se as *Vitis viníferas* utilizadas para a produção de vinhos. Esta espécie deve ser observada com atenção no que diz respeito ao seu potencial qualitativo, especialmente aos seus compostos polifenólicos e aromáticos. A uva apresenta cabo, ou pedúnculo, por onde os vasos de alimentação transportam, para a polpa, os componentes necessários que são produzidos nas folhas pela fotossíntese. Esta é realizada nas folhas verdes da videira e transformam a energia solar em carboidratos, que uma vez fermentado darão origem ao álcool do vinho (REAL, 1981). Na figura 1 destaca-se a baga da uva em corte. Na parte externa o grão de uva possui casca ou película, e na parte interna, geralmente ao centro, as sementes ou grainhas. Estas partes possuem substâncias comuns, ou diferentes, que entrarão na composição do vinho ou suco, pois todo o conjunto será esmagado e preparado para a fermentação.

Conforme Real (1981), taninos são encontrados no engaço, principalmente no pedúnculo, enquanto nas cascas, ou películas, existem, além dos taninos, moléculas responsáveis pelos pigmentos escuros em uvas pretas e rosadas. A polpa, quando madura, possui açúcares, ácidos orgânicos, entre outros compostos químicos. A semente, ou grainha, possui ácidos graxos, taninos e outras substâncias.

Figura1 – Composição do grão da uva



Fonte: Real (1981). A uva, em corte, mostra as partes que a compõem (foto de Miguel Torres, desenho Octavio Pato).

É importante ressaltar que as cascas levam consigo substâncias aromáticas, entre elas compostos fenólicos. As cascas das uvas são de grande importância para as características do vinho. Conforme Anastasiadi et al. (2011), as uvas são particularmente ricas em polifenóis bioativos como antocianinas, flavonóis, flavonoides, estibenos e ácidos fenólicos. Sua biossíntese ocorre durante o desenvolvimento normal, ou como resposta a condições de stress tais como: infecção, fermento e irradiação UV. Em particular, o estilbeno fitoalexina trans-veratrol é sintetizado como resposta a várias formas de stress biótico e abiótico, como fungos, infecções, lesões, geada e metais pesados.

Yilmaz et al. (2014) indicam que a pele e sementes da uva são ricas fontes de compostos fenólicos como os flavonoides e as antocianinas. O autor relata que a presença destes compostos depende de vários fatores, tais como: a variedade, maturidade das uvas, e também envolvem a prática utilizada na viticultura.

### 3.2 INDÚSTRIA VINÍCOLA: PRODUTO E SUBPRODUTO

A indústria vitivinícola é considerada muito importante para algumas regiões do mundo e dos respectivos países. No Brasil encontra-se presente em vários estados e regiões concentrando-se em duas específicas: Serra do Rio Grande do Sul e Nordeste Brasileiro. Esta atividade é especialmente importante para o Rio Grande do Sul por possuir grande importância socioeconômica devido ao seu elevado impacto na geração de emprego e renda. Nesta região, quase a totalidade da produção se destina à agroindústria do suco e do vinho.

Uma das características marcantes dos diferentes segmentos da vitivinicultura é a coexistência de regiões com diferenças climáticas, que vão desde regiões temperadas de

altitude até polos de produção em clima tropical (ZANUS, 2015). Mello (2016) destaca que nos últimos anos, com a implementação das Indicações Geográficas no Brasil, a viticultura tem contribuído fortemente para o desenvolvimento dos territórios envolvidos, promovendo a agregação de valor aos produtos e a valorização de seus respectivos fatores naturais e culturais.

A atividade vitivinícola tem experimentado transformações significativas nos últimos anos em decorrência das contingências que se colocam no cenário do agronegócio brasileiro. Além disso, tem tentado acompanhar as tendências da vitivinicultura mundial. Nesse sentido, o perfil do negócio vitivinícola brasileiro, como um todo, tem evoluído continuamente e o esforço pela procura da excelência e da qualidade tem sido considerável. O Brasil é o maior país da América Latina, sendo considerado o quinto maior produtor vitivinícola do Hemisfério Sul produzindo vinhos desde o começo de sua colonização. A viticultura brasileira ocupa uma área de aproximadamente 83.700 hectares e, em 2015, foram produzidas 1.499.353 toneladas de uvas no Brasil, conforme dados apresentados na tabela 1 (IBGE, 2016).

Tabela 1 – Produção de uvas no Brasil (toneladas)

| <b>Estado/Ano</b> | <b>2013</b>      | <b>2014</b>      | <b>2015</b>      |
|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| Ceará             | 664              | 573              | 940              |
| Pernambuco        | 228.727          | 236.767          | 237.367          |
| Bahia             | 52.808           | 77.504           | 77.401           |
| Minas Gerais      | 12.734           | 11.557           | 12.615           |
| São Paulo         | 172.868          | 146.790          | 142.063          |
| Paraná            | 79.052           | 80.910           | 80.000           |
| Santa Catarina    | 53.153           | 66.106           | 69.189           |
| Rio Grande do Sul | 808.267          | 812.537          | 876.286          |
| Goiás             | 4.581            | 3.330            | 3.492            |
| <b>Brasil</b>     | <b>1.412.854</b> | <b>1.436.074</b> | <b>1.499.353</b> |

Fonte: Mello (2016).

No Rio Grande do Sul, a produção de vinhos, suco e derivados foi de 583.015 milhões de litros em 2015 (IBGE, 2016). O segmento de suco tem sido uma alternativa para a sustentabilidade da vitivinicultura gaúcha, pois tem absorvido uma boa parte da produção de uvas americanas e híbridas que tradicionalmente eram destinadas apenas para a produção de vinhos de mesa.



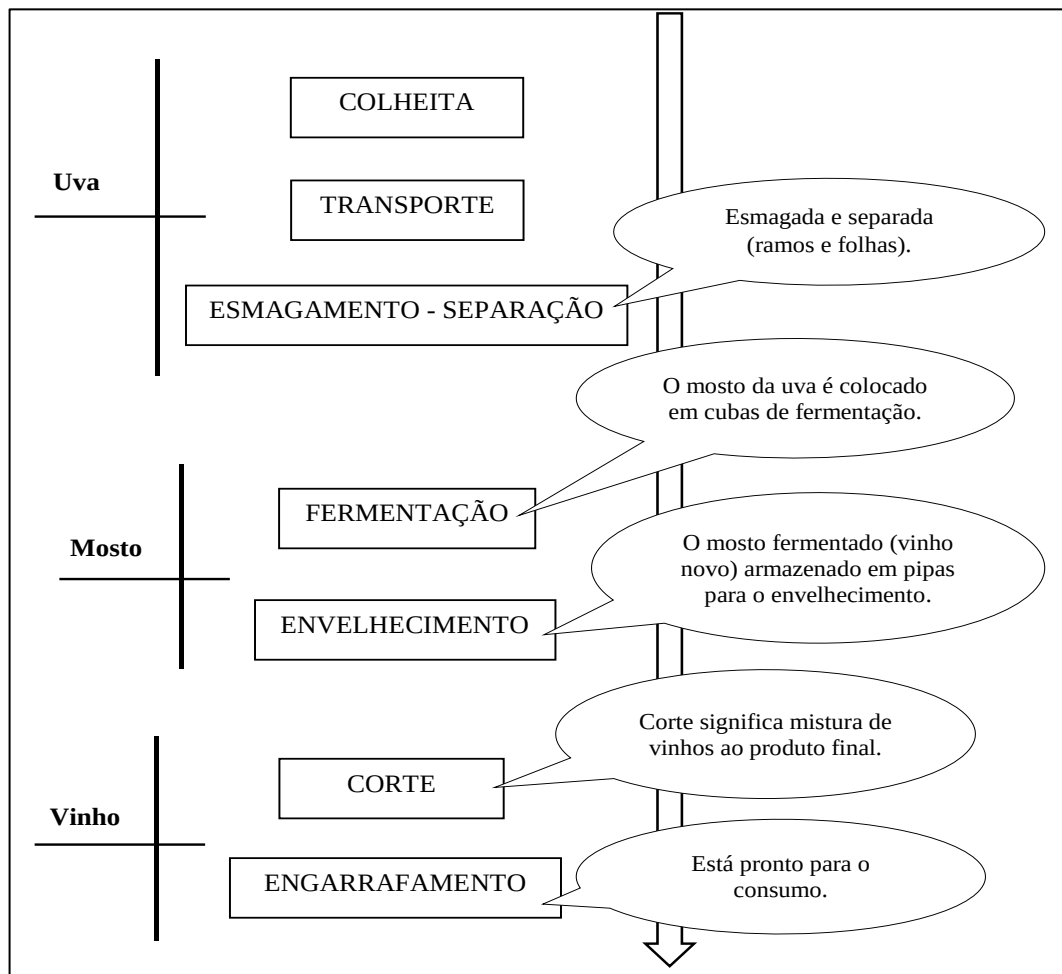
A produção de uvas destinadas ao processamento de vinho, suco e derivados foi de 781.412 milhões de quilos de uvas em 2015, representando 52,12% da produção nacional. O restante da produção (47,88%) foi destinado ao consumo *in natura* (MELLO, 2016). No entanto, há uma grande variabilidade no material genético utilizado, sendo mais de 120 cultivares de *Vitis vinífera* e mais de 40 cultivares de uvas americanas, incluindo castas de *Vitis labrusca*, *Vitis bourquina* e de híbridas interespecíficas (CAMARGO et al., 2011).

Conforme relata o site <http://www.winesofbrasil.com/pt/>, atualmente a produção de vinhos finos no Brasil chega a 10.000 hectares de uvas *Vitis vinífera*. São, aproximadamente, 150 vinícolas elaborando vinhos finos espalhadas pelo país. A indústria vitivinícola brasileira é formada por cerca de outras 1.000 vinícolas, a maioria instalada em pequenas propriedades (média de 2 hectares por família), dedicando-se à produção de sucos, vinhos de mesa ou artesanais.

O processo de vinificação tem início na avaliação das condições sanitárias e da maturação da uva, considerando que esta é mensurada pela medida de sólidos solúveis conhecido como *brix* (os principais são açúcares), presentes na uva. Equipamentos específicos processam o desengaçamento, que consiste em separar o grão do engaço e, posteriormente, o esmagamento, quando as bagas passam por uma prensa de borracha para romper sua casca e liberar o suco (FERNANDEZ, 2008). Após ocorre o chamado processo de fermentação que dá origem ao vinho.

No processamento da uva para a obtenção de sucos, vinhos e derivados, pela indústria vitivinícola, geram-se diversos resíduos como a borra, sementes e o bagaço, sendo este último o mais representativo dos co-produtos (CRUZ et al., 2010). Estima-se que, aproximadamente, 80% da produção mundial de uva seja destinada à fabricação de vinhos, e que para cada 100 litros de vinho são gerados de 25 a 31 Kg de resíduos, sendo de 13 a 17 Kg só de bagaço. Ao considerar que, em 2009, cerca de 680 mil toneladas de uva foram destinadas à produção de sucos, vinhos e derivados, pode-se inferir que a quantidade de co-produto gerado foi de aproximadamente 135 mil toneladas (20%). Na figura 2 destacamos, de forma simplificada, a fabricação do vinho.

Figura 2 – Fluxograma simplificado da fabricação do vinho



Campos (2005) relata que o bagaço de uva é composto por 40% de fibra, 16% de óleo, 11% de proteínas, 7% de compostos fenólicos, açúcares e sais minerais. Relata ainda que a casca da uva é uma fonte de antocianidinas e antocianinas, que são considerados corantes naturais e também possuem propriedades antioxidantes. Este bagaço de uva pode ser considerado um problema ambiental, e possui pH baixo e elevados teores de compostos fenólicos, antibacterianos e fitotóxicos, dificilmente degradados no ambiente. Na figura 3 podemos observar a uva em processo de fermentação.

Figura 3 – Uva no processo de fermentação



Fonte: Clube dos vinhos (2016).

Os problemas agrônômicos associados à aplicação do bagaço de uva no solo podem ser minimizados ou eliminados por vermicompostagem, um processo bio-oxidativo no qual as minhocas deteriorizam interagindo com os micro-organismos no processo de decomposição, acelerando a estabilização da matéria orgânica e modificando as propriedades físico-químicas (DOMÍNGUEZ et al., 2016).

Atualmente estes co-produtos também têm sido aplicados na produção de etanol, para extração de ácidos orgânicos, produção de óleo de semente de uva e outros ingredientes alimentares. Ainda, em muitos casos, é aplicado como fertilizante, ração animal e adubo (CRUZ et al., 2010).

Em outro caminho tem-se que os subprodutos da uva, tanto as sementes como o bagaço, são fontes para extração de antioxidantes. De acordo com sua composição química e devido às suas propriedades, estes subprodutos podem ser úteis como uma fonte de ingredientes funcionais, ou seja, como suplementos alimentares (BARROS et al., 2014; ROCKENBACH et al., 2007).

Conforme Botti (2016), o bagaço é resíduo do processo de elaboração de vinhos e sucos e apresenta valor alimentício comprovado. O autor confirma que este co-produto é rico em polifenóis e antioxidantes naturais. Os compostos que se destacam pela real importância são os flavonoides (antocianina e flavonóis), os estilbenos (resveratrol), além dos ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos) e uma larga variedade de taninos. Estes antioxidantes naturais atuam como sequestradores de radicais livres, promovendo a vasodilatação e inibindo enzimas como fosfolipase, ciclooxigenase e lipooxigenase, além de reduzir a peroxidação lipídica (SOUZA, 2011).

### 3.3 APLICAÇÕES DE CO-PRODUTOS DA UVA

Rondeau et al. (2012) estudaram a extração de taninos condensados a partir de oito amostras de bagaço de uva tinta e branca. O objetivo dos autores era a obtenção de adesivos para madeira. Como resultados foram obtidas diferenças nas composições dos extratos com amostras contendo 3-6% m/m de óleo e 20-46% m/m de açúcares, principalmente glucanos e xiloglucanos. Os autores observaram também baixos teores de polissacárido e pectáceos, sendo que os taninos condensados representaram 20-51% m/m das extrações feitas com água. Quanto às propriedades adesivas, os resultados foram considerados promissores.

Mendoza et al. (2012) utilizaram métodos de extração com solventes e aquecimento (Soxhlet) seguido por fracionamento com hexano, clorofórmio e acetato de etila dos bagaços. A determinação da composição química foi feita por CLAE. Os resultados identificaram que a fase de acetato de etila continha a maior variedade de compostos fenólicos. Quanto aos compostos químicos, a quercetina foi identificada em quase todas as frações. Além disso, os autores avaliaram a atividade antifúngica destes extratos com a *Botrytis cinerea*, sendo que as frações hexano e clorofórmio apresentaram o melhor efeito inibitório sobre o crescimento micelial deste fungo, com um valor IC<sub>50</sub> de 40 ppm. Desta forma, os autores indicaram que o bagaço de uva tem um potencial antifúngico.

Díaz et al. (2013) avaliaram a fermentação de uma mistura de bagaço de uva e casca de laranja através de via hidrolíticas por *Aspergillus awamori*. Estas foram testadas em duas configurações de biorreatores. Os autores consideraram promissores os resultados, indicando ser uma alternativa viável a utilização de bagaços para obtenção de álcoois.

Já Melo et al. (2015) avaliaram o potencial antioxidante de extratos hidroalcoólicos de bagaço de uva. Como resultados indicaram que concentrações moderadas de etanol (43% e 57%) combinada a uma temperatura moderada, foram as melhores condições para a extração de compostos antioxidantes. Nestes extratos foram identificadas moléculas como catequina, procianidina B1, epicatequina e ácido gálico. Além disso, os mesmos apresentaram baixa toxicidade contra células RAW 264. Como conclusão, os autores indicaram que o bagaço tem grande potencial na aplicação das indústrias alimentícia e farmacêutica.

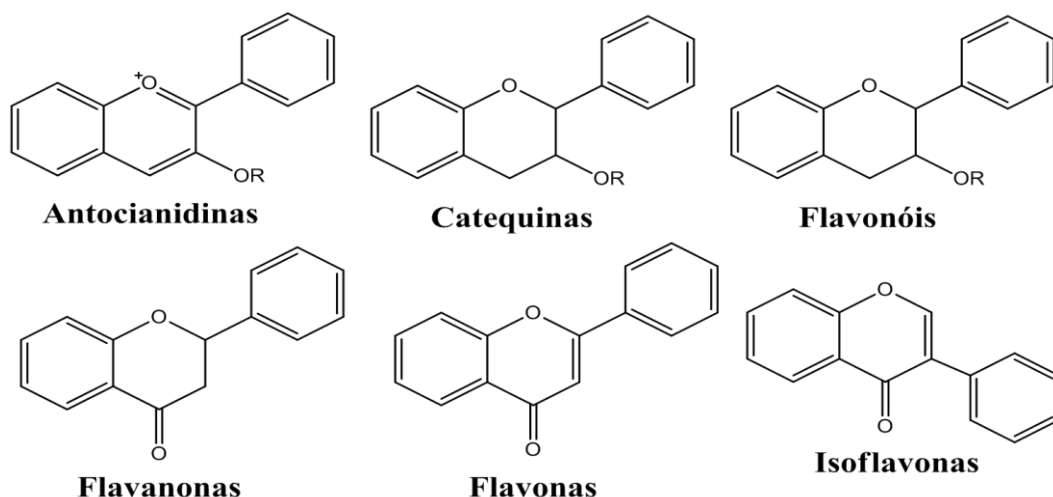
No mesmo caminho, Kabir et al. (2015) foram capazes de extrair polifenóis em bagaço de uva utilizando sistemas enzimáticos de celulase e glucoamilase. Para caracterizar os extratos foram utilizados os métodos DPPH<sup>•</sup> (capacidade antioxidante) e Folin-Ciocalteu (compostos fenólicos totais). Os resultados mostraram que ambos os extratos (extraídos com

celulase e com glucoamilase) de bagaço de uva mostraram-se eficientes como antioxidantes. Assim, os autores indicaram que sistemas enzimáticos são eficientes para extração de compostos ativos a partir de bagaço de uva.

### 3.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS RESÍDUOS DE UVA

A composição química dos resíduos de vinificação é marcada pelos compostos fenólicos como antocianinas, catequinas, ácidos fenólicos, álcoois e estilbenos, como mostra a figura 4 (MENDOZA et al., 2012). Como relata Ferrari (2010), a composição química do bagaço de uva está relacionada com a da intensidade da prensagem que é sofrida durante o processo industrial.

Figura 4 – Estruturas químicas de alguns compostos fenólicos



Segundo Marino et al. (2005), 60% dos polifenóis da uva encontram-se nas sementes e estes apresentam quantidades elevadas de flavan-3-ols, catequina e epicatequina. Assim, a maioria destes compostos são também identificados nos resíduos de uva (FONTANA et al., 2013). Por isso, o bagaço de uva é um dos subprodutos agrícolas que tem recebido a maior atenção dos cientistas (LOMILLO et al., 2014).

No mesmo caminho, Melo et al. (2015) identificaram e quantificaram compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-UV) após processo de extração em subprodutos de uva. Neste trabalho, os autores encontraram onze compostos fenólicos distribuídos em cinco classes diferentes: ácidos gálico e siringal (ácidos hidroxibenzóicos), procianidinas B1 e B2 (proantocianidinas), catequina, epicatequina, galato de epicatequina (flavan-3-ols), 3-D-glicosídeo de quercetina (flavonol), 3-glicosídeo de

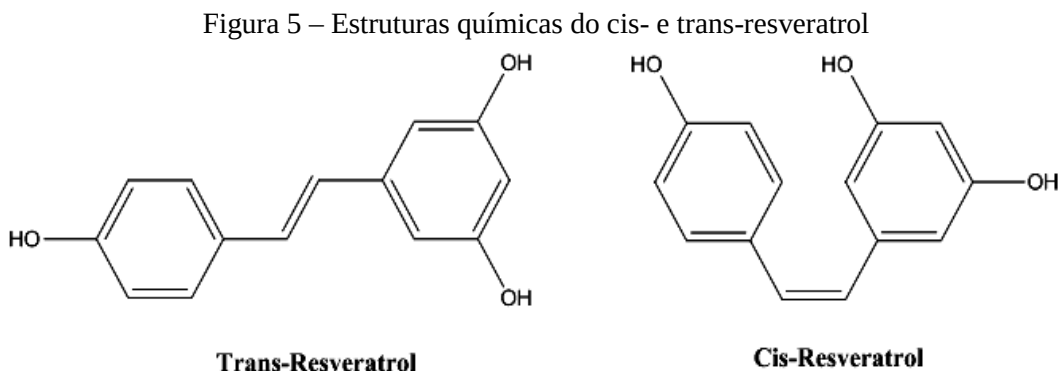
delfinidina, 3-O-glicosídeo de peonidina e 3-glicosídeo de malvidina (antocianinas), catequina, procianidina B1, epicatequina e ácido gálico.

### 3.4.1 Resveratrol

Entre os compostos fenólicos mais conhecidos está o resveratrol, o qual é encontrado na videira estando presente nas folhas. Na uva atua como agente protetor contra os raios ultravioletas. Também inibe o processo da infecção, fator que o inclui numa classe de antibióticos naturais chamados fitoalexinas.

Este composto é encontrado no vinho, sucos de uva e também no resíduo de vinificação. Suas concentrações variam de acordo com a origem e o tipo da uva, o processo de vinificação ou extração do suco e a infecção fúngica ocorrente na videira (FREITAS et al., 2010). Este composto é um polifenol da família das viniferrinas e possui atividade antioxidante capaz de inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (FERNANDES, 2008). Este composto é biosintetizado sob duas formas isoméricas: cis e trans (BOTTI, 2016), como mostra a figura 5 a seguir. O trans-resveratrol é fotossensível e está localizado, principalmente, na casca da uva, sendo transformado e isomerizado para a forma cis na presença de luz.

O resveratrol é um composto fenólico que apresenta atividade de inibição da agregação plaquetária e coagulação. Também apresenta ação anti-inflamatória e regula o metabolismo lipoproteico (BOTTI, 2016). A partir destas propriedades, a medicina oriental tem utilizado este composto, ou frações enriquecidas do mesmo, no tratamento de arteriosclerose, infecções inflamatórias e alérgicas (BOTTI, 2016). Este mesmo autor identificou a presença de resveratrol em resíduos de vinificação.



### 3.5 COMPOSTOS FENÓLICOS COMO ANTIOXIDANTES

Por definição, antioxidante é qualquer substância presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, que retarda ou bloqueia a oxidação deste substrato de maneira eficaz. Conforme Bianchi et al. (1999), os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Os antioxidantes podem ser classificados em dois grupos: enzimáticos e não enzimáticos. Entre os enzimáticos estão a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Os antioxidantes não enzimáticos são moléculas que interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação. Nesta classificação incluem-se os antioxidantes naturais e sintéticos como os compostos fenólicos (ANGELO et al., 2006).

Entre os compostos fenólicos estão as proantocianidinas, as antocianidinas, os flavanoides e as flavonas (SALES et al., 2012). Lomillo et al. (2014) estudaram resíduos de vinificação que apresentaram capacidade antioxidante e propriedades antimicrobianas, também retardaram com sucesso o início da oxidação lipídica no teste Rancimat.

Domínguez et al. (2016) determinaram o teor de compostos fenólicos em bagaço de uva através do método colorimétrico Folin-Ciocalteu. Os autores identificaram altas concentrações de polifenóis como ácido gálico, catequina e epicatequina como principais compostos.

### 3.6 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Diversos estudos destacam a extração de compostos químicos de co-produtos da uva. A obtenção de produtos puros de um extrato é um processo longo, caro e necessita de várias etapas. Normalmente, estes compostos são instáveis e obtidos em quantidades reduzidas; em razão desta realidade é conveniente o uso de diferentes técnicas de isolamento. Assim, a escolha do solvente correto bem como da técnica mais adequada conseguimos obter melhores resultados. Se for escolhido o uso de solventes de baixa polaridade ou apolares obtêm-se compostos mais lipofílicos. No entanto, com solventes alcoólicos ou mais polares é possível obter uma quantidade maior de compostos químicos. Após a obtenção dos extratos brutos, os fracionamentos permitem uma divisão mais fina em frações de distintas polaridades (QUEIROZ et al., 2014).

Atualmente, a descoberta de fármacos provenientes de produtos naturais envolve diversas áreas do saber, bem como diversos métodos de análise. O processo se inicia tipicamente com um botânico ou um etnobotânico, o qual coleta e identifica plantas de interesse medicinal (BAKER et al., 1995). Os métodos de extração são utilizados para a obtenção dos extratos, sendo que estes passam por ensaios para a avaliação de seu potencial biológico. Diversos processos de isolamento e de caracterização das frações são realizados com a finalidade de elucidar as estruturas químicas envolvidas nas atividades observadas (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

De modo geral, antes de se iniciar uma metodologia de extração é necessário verificar a estabilidade dos compostos químicos em relação a cada método. Processos de degradação podem ser originados a partir de diversos fatores como presença de luz, exposição ao ar, tempo de extração e temperatura. Enzimas presentes nas amostras também podem ser liberadas para o solvente de extração e levar a reações de degradação. Radicais livres podem, por exemplo, ser formados e contribuir para a modificação estrutural dos compostos de interesse (BIESAGA, 2011).

Um dos grandes desafios nos processos de extração de moléculas, a partir de matrizes complexas (como o caso dos materiais vegetais), se deve ao fato de que os compostos de interesse estão impregnados dentro das matrizes. Dessa forma, é importante a utilização de técnicas seguras que permitam a extração adequada desses compostos bioativos (TIWARI, 2015). A maior parte dessas técnicas é baseada no poder de extração de diferentes solventes e também na aplicação de aquecimento ou mistura. As técnicas clássicas são compostas pelo uso de soxhlet, maceração e hidrodestilação, sendo que outras técnicas, atualmente, também estão sendo utilizadas como digestão enzimática, extrusão, uso de micro-ondas, fluidos supercríticos e solventes acelerados (AZMIR et al., 2013).

Cada técnica apresenta vantagens e desvantagens intrínsecas, porém a escolha da técnica de extração deve levar em conta a capacidade de solubilização dos compostos de interesse, evitando-se a ocorrência de modificações químicas. A taxa de eficiência de cada método de extração também é influenciada por diversos fatores como o tipo e concentração dos solventes utilizados, razão solvente-sólido, tempo de extração, temperatura empregada, pH, entre outros (ĆUJIC et al., 2016).

A seleção do método para a extração de componentes ativos com o máximo de rendimento e altos níveis de pureza depende, principalmente, da natureza e da estabilidade térmica dos compostos químicos, bem como da natureza do material vegetal a ser processado (SHIRSATH et al., 2012). As técnicas de extração para a obtenção de compostos fenólicos



simples como ácidos benzoicos, aldeídos, ácidos cinâmicos e catequinas, a partir de materiais sólidos e semissólidos, consideravelmente baseiam-se em técnicas de maceração com a utilização de solventes orgânicos. Nessa técnica, a amostra é colocada em contato com solventes, com ou sem agitação, por um longo período de tempo à temperatura ambiente ou sob aquecimento, até a completa solubilização dos compostos químicos no solvente. Porém, devido ao longo tempo envolvido nesse processo de extração, os compostos podem sofrer modificações químicas (GARCIA-SALAS et al., 2010). Em relação a compostos termo sensíveis, técnicas de extração conduzidas em altas temperaturas podem prejudicar a qualidade dos extratos bem como provocar a destruição dos compostos ativos (SHIRSATH et al., 2012).

Diferentemente da maceração, as técnicas de ultrassom são bem conhecidas por apresentarem alta eficiência e redução dos tempos necessários para a extração de compostos biológicos, bem como menor utilização de solventes nos processos além de sua alta reprodutibilidade (KHAN et al., 2010). Muitas classes de compostos têm sido extraídas por técnicas de ultrassom como aromas, pigmentos, antioxidantes e outros compostos orgânicos e minerais a partir de diferentes tipos de matrizes como tecidos animais, microalgas, leveduras, alimentos e vegetais (CHEMAT et al., 2017).

Segundo Yeo et al. (2015), o uso de diferentes técnicas de sonicação reduz, significativamente, o tempo de extração produzindo extratos com maior atividade antibacteriana com redução no consumo de solventes. Esta técnica poderia ser utilizada comercialmente por ser mais econômica e sustentável, sem o comprometimento da qualidade dos extratos. Esse método de extração emprega o uso de ondas de ultrassom que provocam colisões de alta velocidade entre as partículas do material usado na extração e o solvente promovendo uma maior dissolução dos compostos químicos. As taxas de rendimento obtidas nesse tipo de extração estão diretamente ligadas à estrutura, bem como à reologia e à composição do material vegetal, que pode apresentar diferentes graus de resistência às ondas de ultrassom (VILKHU et al., 2008).

As técnicas envolvendo extração por micro-ondas são conhecidas pela eficiência da extração de metabólitos a partir de materiais biológicos diversos. Entretanto, os fatores limitantes dessa técnica estão relacionados com a potência e a frequência utilizadas no equipamento, temperatura de extração, pressão de extração e escolha do tempo de duração da exposição da amostra à radiação de micro-ondas. Outro fator limitante é a escolha do solvente adequado que deve permitir a absorção da energia pelo equipamento (ZHANG et al., 2011).

Por outro lado, os benefícios apresentados por essa técnica estão relacionados ao menor tempo de extração e menor consumo de solventes em relação aos métodos convencionais.

Trusheva et al. (2007) indicam que a utilização da técnica de ultrassom resultou em altos rendimentos, alta seletividade de compostos de interesse, assim como em redução do tempo de extração. Os estudos de Khacha-Ananda et al. (2013) também comprovaram que as técnicas de ultrassom resultaram em extratos, a maior concentração de flavonoides e fenólicos totais, como também maior atividade antioxidante em relação aos extratos obtidos por maceração.

Entre os métodos de extração destacam-se:

- Extração micro-ondas:

Esta técnica tem o princípio no efeito direto da energia de micro-ondas sobre as moléculas através da condução iônica e da rotação dos dipolos. Quando o campo magnético é aplicado há uma migração dos íons e uma movimentação dos dipolos, o que provoca calor. A extração com micro-ondas de compostos fenólicos em resíduos de uva, em cascas e sementes, revela eficiência na recuperação de antioxidantes.

- Extração por ultrassom:

Este método atua na superfície da matriz da amostra produzindo maior contato com o meio de extração. É um processo no qual a energia é dissipada através de ondas eletromagnéticas (cavitação). Têm sido aplicados para a extração de compostos orgânicos não voláteis e pouco voláteis. Alguns autores têm demonstrado a eficiência do método para extração de lipídeos, proteínas e compostos fenólicos das plantas, resíduos de uva (GRAEBIN, 2014). É um método com boa reprodutibilidade, rápido, de baixo custo, além de possibilitar a utilização de amostra de diversos tamanhos de partícula (LUZ, 1998).

- Extração sólido-líquido:

Este é considerado o método padrão para separação/purificação em indústrias. Neste método, a separação da fase líquida pode ser realizada através de processos de filtração, ou mesmo por decantação. No entanto, a eficiência do processo de extração é inversamente proporcional ao tamanho das partículas. Existem duas técnicas de extração: contínua ou descontínua. Se a substância for mais solúvel no solvente orgânico do que na água recorre-se ao método descontínuo, caso contrário utiliza-se o método contínuo. A escolha do solvente é feita a partir da facilidade de dissolução da substância em que se pode isolar o soluto extraído. Caso seja necessária energia (aquecimento) pode-se utilizar uma técnica na qual é utilizado solvente em ebulição (CAMPOS, 2005).

#### **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de artigo científico, que será submetido à revista *Journal of Science Food Agriculture* – Editado pela Wiley.

Chemical composition of extracts from vinification by-products: By solvent,  
ultrasound and microwave assisted methods

Vania Pezzini,<sup>†</sup> Fabiana Agostini,<sup>†</sup> Franco Smirdele,<sup>†</sup> Luciana Touguinha,<sup>‡</sup> Mirian Salvador,<sup>‡</sup>  
Sidnei Moura<sup>†\*</sup>

<sup>†</sup> LBIOP – Laboratory of Biotechnology of Natural and Synthetics Products, Technology  
Department, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brazil.

<sup>‡</sup> LEOA – Laboratory of Oxidative Stress and Antioxidants, Biotechnology Institute,  
University of Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brazil.

**\*Correspondence:** Prof. Dr. Sidnei Moura, University of Caxias do Sul, 1130, Francisco  
Getúlio Vargas st., CEP 95070-560, Caxias do Sul, Brazil.

Phone: + 55 54 3218 2100

E-mail addresses: sidnei.moura@ucs.br

## Abstract

**Background:** According to the exponential increase of the world population, the industry has expanded to meet the demand for food. In this context, industrial waste from the winemaking process is produced on a large scale and often discarded in the environment, causing great impact. However, some of these residues, as wine by-products, had shown valuable compounds because of their structural characteristics and biological activities, such as the flavonoids. In this context, this work aims at the production of enriched extracts in active biomolecules from grapes juice industry by-products through four different extraction methods.

**Results:** As results, we observed different yields as well as chemical composition, from the extraction methods: liquid-liquid; Ultrasound; and Microwave, with variation of the solvents polarity. The chemical composition was determined by High Efficiency Liquid Chromatography with UV-Vis detector, with the identification of 6 compounds: catechin, resveratrol, hesperidin, gallic acid, epicatechin, naringin in concentrations ranging from 0.01 to 5.01 mg/Kg. In addition, the extracts were evaluated by High Resolution Mass Spectrometry (HRMS), where 14 were identified, with the presence of glycosylated flavonoids, in the ESI (+) and ESI (-) modes. Also, the crude extract was fractionated through open column with silica as stationary phase, which made it possible to obtain enriched extracts in Resveratrol (maximum of 5.9  $\mu\text{g/mL}$ ), with increasing solvent polarity. The antioxidant activity and the total phenolic content were evaluated by the DPPH and Folin-Ciocalteu method respectively, highlighting these fractions obtained with polar solvents. The percentage of inhibition of the DPPH radical was ranging from 14.2 and 74.2%, and the total phenolic content expressed in mg/100g Gallic acid, ranging from 0.1 and 107.0mg GAE/100g.

**Conclusion:** The grape juice industry's by-product can be better utilized, with applications ranging from the food industry, cosmetics, among others, according to a wide range of phenolic compounds present. In this way, the microwave assisted extraction using polar solvents, such as ethanol and water, showed the best yield and chemical composition rich in flavonoids. Thus, it has been showed that it is possible to transform an environmental problem into a product rich in antioxidant compounds.

**Keywords:** Grape; Industrial By-products; Extraction; HPLC-UV; HRMS; Flavonoids.

## INTRODUCTION

In the last century, the world population has increased fivefold. In 1900, it was about 1.5 billion people, while in 2000 there were almost 7 billion humans on the planet.<sup>1</sup> At this rate, the planet should reach 2100 with 11.2 billion human beings, a growth of 53% compared to the present. This fact has required an industrial expansion, with a recurring increase in waste generated from processes, which need to be conveniently discarded.

Inserted in this context is the wine sector, which is generating a large number of by-products. The grape is cultivated all over the world mainly in the temperate zone with a total of 107.3 million tons of which 57% was used for winemaking in 2014.<sup>2</sup> However, its residue has attracted researchers' attention, because its chemical composition is based on phenolic compounds, which are natural antioxidants. These secondary metabolites are produced in plants, also in *Vitis labrusca*, as a response to various forms of environmental stress.<sup>3</sup> Its features are attributed to the polyunsaturation, able to reduce the activity of free-radicals as scavengers, electron or hydrogen donors and strong metal chelators, thus preventing the lipid peroxidation, DNA damage and others.<sup>4-5</sup>

Nevertheless, these compounds are not homogeneously distributed on plants tissue, cellular and subcellular levels, while the insoluble are the cell walls constituents, the soluble are compartmentalized within the plant cell vacuoles.<sup>6-9</sup> Also, the chemical nature of these compounds can range from low to highly polymerized substances, including a variable proportion of phenolic acids, anthocyanins and tannins.<sup>10</sup> By the way, the extraction efficiency is directly influenced by the energy method, the compounds thermal stability, the sample particle size, as well as the other substances interferences (in complex mixtures as plants extracts). In recent years it's been featured the evolution of some techniques, which have been applied to phenolic extraction, such as ultrasound for propolis samples.<sup>11</sup> In this way, microwave has also been applied for extraction of active compounds of plants.<sup>12</sup>

Therefore, this work aims the reduction of an environmental problem, caused by wineries by-products, with the generation of a value-added product as enriched phenolic extracts. Thus, different extraction methods were tested: microwave; Ultrasound; conventional liquid-liquid system with different solvent. The chemical characterization was by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC-UV), and High Resolution Mass Spectroscopy (HRMS). The antioxidant capacity of the extracts, were determined by the DPPH method, and the total phenolic was determined by Folin-Ciocalteu method.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Chemicals**

Calibration curves for HPLC were constructed for the following polyphenols standards: gallic acid, catechin, chlorogenic acid, epicatechin, rutin, ferulic acid, naringin, hesperidin, myricetin, resveratrol, quercetin and vitexin (all obtained from Sigma-Aldrich). The acetonitrile HPLC (chromatographic analyses) grade was purchased from Sigma–Aldrich also. For the chromatographic analyses HPLC-grade ultrapure water was prepared using a Milli-Q system. The solvents used for extraction process (hexane, chloroform, ethyl acetate, ethanol, water) in P.A. grade, were purchased from Merck®

### **Grapes by-products**

Grapes of varieties of *V. labrusca* L. Bordo and Isabel were cultivated in the State of Rio Grande do Sul, in the Southern Region of Brazil. The grapes were cultivated in the conventional systems were used for grape juice preparation through an industrial-scale technological process. The grapes were manually harvested at the stage of technical maturity, with soluble solids readings between 14 and 20 Brix, according to OIV.<sup>13</sup> After harvesting, grapes were kept separately at room temperature (20°C) until juice processing within a period of 2 days. The juice was produced through a continuous-flow process, with the grapes berries crushed using an industrial mechanical crusher (EDA, São Paulo, Brazil) and immediately pumped through a tubular heat exchanger (85 ± 1°C for 10s) (Boff, Vacaria, Brazil). The extracted grape juice was centrifuged at 5000g for 10min using a 600 Series Pieralisi decanter centrifuge (Jesi, Italy). This solid by-product carried-out from centrifugation process was the one used in this work. After this process, and before the extraction, it was maintained at 4°C in the absence of light, for a maximum period of 20 days.

## **EXTRACTION METHODS AND FRACTIONATION**

### **Ultrasound**

Ultrasound assisted extraction was performed as described by Oliveira.<sup>14</sup> Briefly, 5g of grape by-product were weighed individually, to which were added 100ml of each solvent (hexane, ethylic alcohol, chloroform, ethyl acetate and ultra-pure water). Extractions were carried-out with ultrasound probe (model Vibra-cell, Sonics®), working at 30% of amplitude and potency 500W for a period of 20min. After, samples were filtered, and the respective solvents were dried under vacuum in a rotary evaporator. The resulting samples were conditioned at -20°C for further evaluation.

### **Microwave**

The microwave extractions were performed as described by Barba et al.<sup>15</sup> Briefly, to 2g of grape by-products were weighed individually 10ml of each solvent (hexane, ethylic alcohol, chloroform, ethyl acetate and ultra-pure water). The extractions were performed at 110°C for a period of 20min, at 850W of potency, using the microwave equipment (Monowave 300, Anton Paar®). After the samples were filtered and dried under vacuum (rotatory evaporator). The resulting samples were conditioned at -20°C for further evaluation.

### **Liquid-liquid**

The liquid-liquid process was adapted from Mendoza et al.<sup>16</sup> Briefly, 10g of by-products were extracted with solvents in increasing order of polarity (hexane, after chloroform, after ethyl acetate, and after ethylic alcohol (3 × 30mL, for each solvent) using a separation funnel. After separation, the solvent was filtered and dried under vacuum (rotatory evaporator) individually. The resulting samples were conditioned at -20°C for further evaluation.

### **Fractionation**

The fractionation was conducted using an open column (4cm × 45cm) with 147g of silica gel and 22.4g of grape by-product. Initially chloroform (100-60%), and ethyl acetate (0-



40%) was used as mobile phase. After, the mobile phase was changed to methanol (5-100%) and ethyl acetate (95-0%). 255 fractions were collected and analyzed by thin layer chromatography (TLC), using mobile phase constituted by chloroform: ethyl acetate (7:3). The TLC plates were visualized under UV light at 254 and 365nm, and also stained with vanillin-sulphuric acid spray and further heating. The fractions with similar chromatographic profiles were pooled and the solvent was removed by rotary evaporator. Altogether, 12 different fractions were obtained.

### **HPLC analysis**

All HPLC analyses were carried out on a Hewlett-Packard 1100 system equipped with quaternary pump, auto-sampler, degasser and UV-VIS detector. The column used was a Lithosphere C18 (250mm × 4mm, particle size 5µm) with a guard column of the same material. Chromatographic data were acquired and processed using the HP ChemStation software. Mobile phase consisted of solvent A (aqueous solution with 1% v/v phosphoric acid) and solvent B (ACN). The injection volume was 5 µL and polyphenols were eluted using a gradient system with 90% A for 5min, 60% A 5 to 40min and then 90% A 45 to 50min. Run time was 50min and the flow was 0.5mL/min. The analysis was monitored at 210nm according to modified chromatographic method reported by Morelli.<sup>17</sup> The samples were filtered through a 0.45µm nylon membrane prior to analysis. Peaks were identified by comparing their retention time and UV–Vis spectra with reference compounds and data were quantified using the corresponding curves of the reference compounds as standards (gallic acid, catechin, chlorogenic acid, epicatechin, rutin, ferulic acid, naringin, hesperidin, myricetin, resveratrol, quercetin and vitexin). All standards were dissolved in methanol and the results were expressed in mg/Kg of extract.

### **Mass analysis**

The ethyl acetate total extract and the fractions were diluted in a solution of 50% (v.v) chromatographic grade acetonitrile (Tedia, Fairfield, OH, USA), 50% (v/v) deionized water and 0.1% formic acid. The solutions were infused directly individually or with HPLC (Shymadzu) assistance into the ESI source by means of a syringe pump (Harvard Apparatus) at a flow rate 10µL.min<sup>-1</sup>. ESI(+)-MS were acquired using a hybrid high-resolution and high accuracy (5µL) microTOF-QII mass spectrometer (Bruker® Daltonics) under the following

conditions: capillary and cone voltages were set to +3500V and +40V, respectively, with a desolvation temperature of 100°C. Diagnostic ions were identified by the comparison of exact  $m/z$  with compounds determined in previous studies. For data acquisition and processing, Hystar software (Bruker® Daltonics) was used. The data were collected in the  $m/z$  range of 70-800 at the speed of two scans per second, providing the resolution of 50.000 (FWHM) at  $m/z$  200. No important ions were observed below  $m/z$  100 or above  $m/z$  800.

### **Total phenolic content**

Ethyl acetate total extract and the fractions (04-11) were individually diluted in a hydrochloric solution (70%) at a concentration of 0.5mg/mL. Each sample (0.5ml) was diluted in a Folin-Ciocalteu solution 0.2 N (2.5ml) for 5 minutes. After, 2ml of sodium carbonate solution (7.5%) was added and the samples were incubated at  $50^{\circ} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$  for 5min. The absorbance of the reactions was measured at 760nm at spectrophotometer.<sup>18</sup> Gallic acid was used as a standard compound in a range of 20-220µg/mL to construct a standard curve.

### **Antioxidant activity**

DPPH• radical scavenging activity of the extracts were measured using a method modified from that of Yamaguchi *et al.*<sup>19</sup>. The extracts obtained in the ultrasonic, microwave and liquid-liquid extractions were added to the Tris-HCl buffer (100nm, pH 7.0) containing 250µm of DPPH• dissolved in ethanol. Tubes were stored in the dark for 20 minutes and then the absorbance was read at 517nm (model UV-1700 spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan). Results were expressed as percentage of inhibition of the DPPH• radical.

### **Statistical Analysis**

Phenolic quantification and antioxidant activity were expressed as mean  $\pm$  standard deviation obtained from three independent experiments. Statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version 21.0) for Windows (Illinois, USA). Kolmogorov–Smirnov test was used to assess for the parametric distribution of data. Statistical significance was evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukeys post hoc test. Results are deemed significant if  $p$ -value was less than 0.05.

## Discussion and Results

As a result of the accelerated increase in the population density, there is a greater demand for industrial products, with consequent waste generation.<sup>20</sup> Among these residues, there are some with a high incidence of active antioxidant compounds, such as the residues from the wineries (grape juice processing and derivatives). The state of Rio Grande do Sul is the main producer of wines and derivatives in Brazil.<sup>21</sup>

Melo et al.<sup>22</sup> and Anastasiadi et al.<sup>23</sup> in recent works, have determined the existence of phenolic compounds in wine by-products, which can be reused in pharmaceuticals, cosmetics and food additives sectors. However, there is a need to develop efficient and selective extraction methods to obtain enriched extracts in phenolic compounds. On this way, we tested three different processes using solvents with different polarities and different energy forms (Microwave and Ultrasound). Table 1 shows the yield results (*m/m*) for the tested processes.

Table 1.

Liquid-liquid is a traditional extraction technique of metabolites in plants and derivatives, which is related to the solubility difference of the chemical compounds.<sup>16</sup> The procedure advantages are the possibility of parameters adjustment such as pH, temperature, time, particle size of the initial solid, among others. In this work, a higher relative yield in the extracts with apolar solvents (hexane) and polar (ethanol and water) were observed. And the yield has been ranging from 0.1 to 2% with water, ethanol and hexane<sup>16</sup>.

Except for hexane, the extracts yields carried-out from ultrasound were quite similar which to those obtained with liquid-liquid, Table 1. In this process, occurs the phenomenon known as cavitation, which improves the transference of heat through the cell walls, facilitating the extraction of bioactive compounds. Palma and Barroso<sup>24</sup> tested ultrasound to extract tartaric and malic acid from winemaking by-products. As a result, the amount ranges from 130 to 199 ppm and 33 to 41 ppm of tartaric and malic acid respectively. The authors had used methanol and water as solvents with variation of volume, temperature and time, as well as ultrasound amplitude.

The microwave assisted extraction showed the highest relative yields. This procedure has also been used to obtain bioactive plants and derivatives.<sup>15</sup> In this process, the electromagnetic energy, between 300MHz and 300GHz, is transferred in form of heat by ionic conduction being enough to break the cells and release the active compounds. In the same

way, the process involves diffusion of the solvent through the sample matrix and consequent release of the metabolites.<sup>15</sup> In addition, it is possible to make a temperature and energy gradient, facilitating the extraction without degradation of the active principles, evaluated the effects of microwave assisted extraction with polar solvents (water and ethanol) on wineries by-products, which were dried in different ways.<sup>25,26</sup> The yields obtained by the authors were ranging from 2 to 16%, which the air dried showed the best results.

The chemical composition of the extracts and fractions is directly related to the solvents and the extraction methods used. For the qualification and quantification of the chemical compounds present in the extracts, we used High Performance Liquid Chromatography (CLAE-UVis) detector, in method adapted from Morelli et al.<sup>17</sup> The Figure 1 shows the selectivity of the analysis, where 12 compounds could be simultaneously analyzed (gallic acid, catechin, chlorogenic acid, epicatechin, rutin, ferulic acid, naringin, hesperidin, myricetin, resveratrol, quercetin and vitexin).

The chromatographic methods with different detectors have been widely used for the qualification and quantification of phenolic compounds in extracts of plants and industrial residues. For grape by-products using HPLC-UV, Brazinha et al.<sup>27</sup> and Anastasiadi et al.<sup>23</sup> had demonstrated selectivity analysis of four compounds (gallic acid, catechin, epicatechin and ferulic acid) and fourteen (gallic acid, catechin, epicatechin, procyanidin B2, epicatechin gallate, trans-resveratrol, quercetin, kaempferol, quercetin-3-O-galactoside, quercetin-3-O-glucoside, quercetin-3-O-coumaric acid and ferric acid) respectively.

Figure 1.

The Table 2 shows the parameters related to the analysis method developed for the evaluation of the phenolic compounds. Thus, for each standard a calibration curve was made, with determination of linearity coefficients  $R^2$ , as well as LOD detection limits and LOQ quantification.

Table 2.

In our extracts, six of these compounds were identified, which are presented in Table 3. The gallic acid and naringin were the most prevalent ranging from 1.8 to 33.9mg/Kg and 0.3 to 5.6mg/Kg respectively in the microwave assisted extraction. By solvents, the most polar (ethanol and water) presented the highest amount of the evaluated compounds.

According to our results, between the solvents investigated in the extraction of phenolic compounds, ethyl acetate and ethanol have been quoted for its efficiency.<sup>28</sup> In this way, catechins successful carried-out from grape berry using methanol and ethyl acetate as solvents by the shaker extraction method.<sup>29</sup> By this same method Ribeiro et al.<sup>30</sup> had extracted phenolic acids, among them gallic acid, using the polar solvents, ethyl acetate and water. As a main feature, the Resveratrol has been identified in ethanol and ethyl acetate from liquid-liquid, and microwave assisted extraction in concentrations ranging from 0.9 to 7.6mg/kg. Careri et al.<sup>31</sup> and Yilmaz et al.<sup>32</sup> identified the presence of resveratrol in wine-making residues. Trans-resveratrol is a phytoalexin and belongs to the class of stilbenes, consequently they are found in grape by-products, especially in red varieties.

Table 3.

Oliveira et al.<sup>14</sup> extracted winemaking by-products using ethanol, water and ethyl acetate with ultrasound and identified gallic acid, p-OH-benzoic acid, vanillic acid and epicatechin by CLAE-UV in concentrations ranging from 0.5 to 5.1mg/Kg. In the same way, Melo et al.<sup>22</sup> extracted grapes pomace and rachis using solvents of different polarity, including water and ethanol. The authors identified eleven different compounds, among them gallic acid, catechin, epicatechin in amounts ranging from 0.1 to 7.4mg/Kg.

In order to obtain fractions enriched in phenolic compounds, we tested the open column fractionation using chloroform, ethyl acetate and methanol as mobile phase and silica as the stationary phase. Thus, 255 fractions were separated, which after preliminary analysis (Thin Layer Chromatography – TLC), were joined in a group of 12 with similar composition. The Table 4 described the identified compounds (gallic acid, catechin and resveratrol) by CLAE-UV. Resveratrol was extracted in higher concentrations in the fractions with chloroform: ethyl acetate (7:3 until 3:4). All fractions collected by the fractionation method showed the presence of gallic acid. Nugroho et al.<sup>33</sup> also used open column for the isolation of phenolics from leaves of the species *Carica papaya*. The authors had used CHCl<sub>3</sub>–MeOH–H<sub>2</sub>O (70:30:10, lower phase) as a mobile, carried-out 186 fractions where the myricetin-3-rhamnoside, kaempferol-3-rutinoside, quercetin, kaempferol, and other phenolics were isolated.

Table 4.

High Resolution Mass Spectrometry (HRMS) is a powerful tool for identification of natural metabolites, for instance phenolics<sup>34</sup> and alkaloids<sup>35</sup> in complex mixture as extracts. By HRMS, a set of information as exact mass and isotopic ratio can be used in the chemical identification.<sup>36,37</sup> In addition, for unequivocal identification and differentiation of isobaric interferences, the fragmentation pathway is also powerful tool. In the extracts and fractions was possible to identify 14 compounds by ESI (+) and ESI (-) mode, which are described in Table 5. The Figure 2 shown a spectrum of HRMS in full ESI (-) mode for extract carried-out in ultrasound using Hexane as solvent.

Table 5.

Figure 2.

The Figure 3 shows the chemical structures of the all compounds identified by HRMS. The technique used in this work allowed the identification of two glycosides, malvidin-O-glycoside and quercetin-3-O glycoside. Casas et al.<sup>42</sup> carried-out extracts of grape using methanol and water under pressure over which were determined polyphenolic compounds by HRMS being identified also gallic acid, catechin, epicatechin. Also, the authors had reported the presence of resveratrol, stilbenes and derivatives such as O-glucosides, which was found in the grapes stems.

Figure 3.

The flavonoids such as quercetin, malvidin and resveratrol, beyond the glycosylated, such as quercetin-3-O-glucoside and Malvidin-3-O-glucoside, are known for their *in vivo* antimicrobial, antifungal and antioxidant activities.<sup>14,16,43</sup> These natural antioxidants act as free radical scavengers, promoting vasodilation and inhibiting enzymes such as phospholipase, cyclooxygenase and lipoxygenase, in addition to reducing lipid peroxidation.<sup>44</sup>

### **Antioxidant capacity**

Phenolic compounds have been featured as an important source of natural antioxidants. The extracts were evaluated by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method, Table 6.

Table 6.

Considering the solvents, the extracts with the highest antioxidant capacity were those obtained with ethyl acetate and ethanol. Meanwhile, comparing the extraction modes, the ultrasound allowed us to obtain the highest percentage ( $74.22 \pm 2.07\%$ ) of scanning with ethyl acetate solvent. In the liquid-liquid extraction, the highest percentage of sweep was obtained by the ethyl acetate and ethanol solvents. In the microwave extraction, the highest percentage of scanning was  $36.64 \pm 2.44\%$ , using ethanol as solvent. In the same way, Brazinha et al.<sup>27</sup> had reported that hydro alcoholic extracts showed higher DPPH values (up to approximately 80%).

Kabir et al.<sup>44</sup> had used enzymatic digestion for phenolic compounds extraction from grape by-products. The obtained extracts showed a percentage of DPPH radical scan around 60 and 70%. Rajha et al.<sup>45</sup> carried out a study with ground grape, using solid-liquid extraction with water as solvent, varying time and temperature parameters. According to the authors, the scanning activity of the DPPH radical was 11% to 35%, which corroborates with the results of the present study.

### Total phenolic compounds

The phenolic compounds found in grapes and derivatives can be classified into three main groups: (1) phenolic acids as benzenic and hydroxycinnamic; (2) flavonoids as catechins, flavanols and anthocyanins; and (3) tannins and proanthocyanidins.<sup>20</sup> To determine the amount of total phenolic, was used the Folin-Ciocalteu method adapted from Roesler, et al.<sup>18</sup>. Comparing the extractions methods, it was observed that the samples with higher content of polyphenols also had higher antioxidant activity, Table7.

Table 7.

In general, the extraction by ultrasound were inferior to those obtained in the microwaves and liquid-liquid. However, the microwaves crude extracts showed the best results ( $0.04 \pm 13.18$  to  $6.02 \pm 107.03$ mg GAE/100g). Kabir et al.<sup>44</sup> using enzymatic digestion for phenolic extraction, reported range from 33.19 to 41.05mg in comparison of chlorogenic acid EQ/g dry bagasse. Yilmaz et al.<sup>46</sup> reported that higher total phenolic contents were found in the peel and seeds of the residues when compared to pulp. The polyphenols of grape differ

significantly, depending mainly on the cultivar, the vintage, the degree of maturation and the technology applied during the vinification. Corrales et al.<sup>47</sup> and Centeno et al.<sup>48</sup> had tested extractions of grape by-products with ultrasound, using water and ethanol as solvents, with results ranging from  $0.20 \pm 6.17$ mg GAE/100g;  $0.56 \pm 5.31$ mg GAE/100g;  $1.22 \pm 31.47$ mg GAE/100g and  $7.62 \pm 28.66$ mg GAE/100g of total phenolics and antioxidant capacity by DPPH respectively. The authors suggest that the application of ultrasound power improves the efficiency and yield of the extraction process, being faster and accelerating over time in a comparison between extractions methods for grape by-products.

## Conclusion

In summary, this work had demonstrated that *Vitis labrusca* varieties, widely cultivated in southern Brazil, also have a high antioxidant potential, which is associated with the presence of phenolic compounds. On the extraction methods, the microwave, with polar solvents, presented the best results regarding the presence of bioactive compounds. Furthermore, we have shown that the residues of vinification, which are normally discarded as an environmental problem, can be reused.

## Acknowledgments

The authors thank CAPES, CNPq and FAPERGS for the financial support.



## REFERENCES

- 1 United Nations Population Division, Department of Economic and Social Affairs. World Population Prospects (online - <https://esa.un.org/unpd/wpp/>) (2015).
- 2 Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO – ([www.fao.org](http://www.fao.org)).
- 3 Naczek M and Shahidi F, Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* 1054: 95-111 (2004).
- 4 Afanasev IB, Dorozhko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA, Potapovitch AI, Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology* 38:1763-1769 (1989).
- 5 Blokhina O, Virolainen E and Fagerstedt KV, Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Annals of Botany* 91:179-194 (2003).
- 6 Pridham JB, Phenolics in Plants in Health and Disease. Pergamon Press, Beckman
- 7 Beckman CH, Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiol. Mol. Plant Pathol* 57:101-110 (2000).
- 8 Bengoechea ML, Sancho AI, Bartolomé B, Estrella I, Cordovés, CG, Hernández T. H. J. *Agric. Food Chem* 45:4071 (1997).
- 9 Ibrahim R, Barron PM, Dey JB, Harborne E, Methods in Plant Biochemistry. Academic Press, pp. 75-111 (1989).
- 10 Towers GHN and Harborne JB, Biochemistry of Phenolic Compounds, Academic Press, pp. 249-294 (1964).
- 11 Yeo KL, Leo CP, Chan DJC, Ultrasonic Enhancement on Propolis Extraction at Varied pH and Alcohol Content. *Journal of Food Process Engineering*, v. 38, n. 6, p. 562-570 (2015).
- 12 Zhang HF, Yang XH, Wang Y, Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. *Trends in Food Science and Technology*, v. 22, n. 12, p. 672-688 (2011).
- 13 International Organization of Vine and Wine – OIV ([www.oiv.int](http://www.oiv.int)).
- 14 Oliveira D, Salvador AA, Smânia A, Smânia E, Maraschin M, Ferreira S, Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. *Journal of Biotechnology* 164:423-432 (2013).
- 15 Barba DFJ, Zhu Z, Koubaa M, Souza A, Sant A, Vibeke O, Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science & Technology* 49:96-109 (2016).
- 16 Mendoza LK, Yañez K, Vivanco M, Melo R, Catoras M. Characterization of extracts from winery by-products with antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Industrial Crops and Products* 43:360-364 (2013).
- 17 Morelli LLL, Avaliação de compostos fenólicos majoritários em geleia de uva produzida com a variedade IAC-138-22 (máximo). Dissertação de Mestrado, SP, 133 (2010).
- 18 Roesler R, Malta LG, Carrasco LC, Holanda RB, Sousa CAS, Pastore GM, Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciênc Tecnol Aliment* 27:53-60 (2007).
- 19 Yamaguchi T, Takamura H, Matoba TC, Terao J, Free radical scavenging activity of grape seed extract and antioxidants by electron spin resonance spectrometry in an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NaOH/DMSO system. *Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry* 62:1201-1204 (1998).

- 20 Fontana AR, Antonioli A and Bottini R, Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics. *J. Agric. Food Chem* 61:8987-9003 (2013).
- 21 Burin VM, Lima NEF, Panceri CP, Luiz MTB, Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of different extraction methods. *Microchemical Journal* 114:155-163 (2014).
- 22 Melo P S, Adna P M, Carina D, Luciana FS, Marcelo F, Giuliano EP, Thais MFSV, Pedro LR, Severino MA, Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. *Food Chemistry* 181: 160-169 (2015).
- 23 Anastasiadia M, Harris P, Dimitris K, Alexios LS, Serkos AH, Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their in vitro antioxidant properties, *Food Science and Technology* 48:316-322 (2012).
- 24 Palma M. and Barroso CG, Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. *Analytica Chimica Acta* 458:119-130 (2002).
- 25 Torre MPD, Vera CF, Capote FP, Castro MDL. Anthocyanidins, proanthocyanidins, and anthocyanins profiling in wine lees by solid-phase extraction-liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry with data-dependent methods. *J. Agric. Food Chem* 61:12539-12548 (2013).
- 26 Drosou C, Konstantina K, Andreas B, Dimitrios T, Magdalini KA, Comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Industrial Crops and Products* 75:141-149 (2015).
- 27 Brazinha C, Mafalda C, João G.C, Optimization of Extraction of Bioactive Compounds from Different Types of Grape Pomace Produced at Wineries and Distilleries. *Journal of Food Science* Vol. 79, Nr. 6 (2014).
- 28 Spigno G, Tramelli L and Faveri DM, Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering* 81:200-208 (2007).
- 29 Jin Z-M, Bi H-Q, Liang N-N, Duan C-Q. An Extraction Method for Obtaining the Maximum Non-Anthocyanin Phenolics from grape Berry Skins. *Analytical Letters* 43(5): 776-785 (2010).
- 30 Ribeiro LF, Ribani RH, Francisco TMG, Soares AA, Pontarolo R, Haminiuk CW I, Profile of bioactive compounds from grape pomace (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) by spectrophotometric, chromatographic and spectral analyses. *Journal of Chromatography B* 1007: 72-80 (2015).
- 31 Careri M, Claudio C, Lisa E, Isabella N, Ingrid Z, Direct HPLC Analysis of Quercetin and trans-Resveratrol in Red Wine, Grape, and Winemaking Byproducts, *J. Agric. Food Chem* 51:5226-5231 (2003).
- 32 Yilmaz Y and Romeot T, Major Flavonoids in Grape Seeds and Skins: Antioxidant Capacity of Catechin, Epicatechin, and Gallic Acid. *J. Agric. Food Chem* 52:255-260 (2004).
- 33 Nugroho A, Heryani H, Choi JS and Park H, Identification and quantification of flavonoids in *Carica papaya* leaf and peroxynitrite-scavenging activity. *Journal of Tropical Biomedicine* 7:208-213 (2016).
- 34 Rufatto LC, Finimundy TC, Roesch ME and Moura S, *Mikania laevigata*: Chemical characterization and selective cytotoxic activity of extracts on tumor cell lines, *Phytomedicine* 20:883-889 (2013).

- 35 Nicola C, Salvador M, Gower AE, Moura S, Echeverrigaray S Chemical Constituents Antioxidant and Anticholinesterasic Activity of *Tabernaemontana catharinensis* The Scientific World Journal 519858 (2013).
- 36 Bristow AWT and Webb KS, Intercomparison Study on Accurate Mass Measurement of Small Molecules in Mass Spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom 14:1086-1098 (2003).
- 37 Knolhoff AM, Callahan JH, Croley TR, Mass Accuracy and Isotopic Abundance Measurements for HR-MS Instrumentation: Capabilities for Non-Targeted Analyses. J. Am. Soc. Mass Spectrom 25:1285-1294 (2014).
- 38 Sasaki K, Takase H, Kobayashi H, Matsuo H, Takata R, Molecular cloning and characterization of UDP-glucose: furaneol glucosyl transferase gene from grape vine cultivar Muscat Bailey A (*Vitis labrusca* × *V. vinifera*). Journal of Experimental Botany 66:6167-6174 (2015).
- 39 Silva RM, Campanholo VMLP, Paiotti APR, Artigiani Neto R, Oshima CTF, Ribeiro DA, Forones NM Chemopreventive activity of grape juice concentrate (G8000TM) on rat colon carcinogenesis induced by azoxymethane Environmental Toxicology and Pharmacology 40(3): 870-875 (2015).
- 40 Koyama K, Kamigakiuchi H, Iwashita K, Mochioka R, Phytochemistry Polyphenolic diversity and characterization in the red e purple berries of East Asian wild *Vitis* species. Phytochemistry 1-9 (2016).
- 41 Kurt A, Torun H, Colak N, Seiler G, Ahmet F. Nutrient profiles of the hybrid grape cultivar “Isabel” during berry maturation and ripening. Journal of the Science of Food and Agriculture (2016).
- 42 Casas MA, Marta P, Marta L, Carmen GJ. Characterization of grape marcs from native and foreign white varieties grown in northwestern Spain by their polyphenolic composition and antioxidant activity. Eur Food Res Technol DOI 10.1007/s00217-015-2573-0 (2015).
- 43 Lomillo JG, Luisa MGS, Raquel DPG, Dolores M. DRP, Pilar MR, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Wine Byproducts and Their Potential Uses in the Food Industry. J. Agric. Food Chem 62:12595-12602 (2014).
- 44 Kabir F, Mosammad SS and Kurnianta H, Polyphenolic Contents and Antioxidant Activities of Underutilized Grape (*Vitis vinifera*) Pomace Extracts. Prev. Nutr. Food Sci 20:210-214 (2015).
- 45 Rajha HN, Nada ED, Eugène V, Nicolas L, Richard G. M, An Environment Friendly, Low-Cost Extraction Process of Phenolic Compounds from Grape Byproducts. Optimization by Multi-Response Surface Methodology. Food and Nutrition Sciences 4:650-659 (2013).
- 46 Yilmaz Y, Zekiye G, Erdogan SS, Aysun Ö, Arif A, Cengiz Ö, Antioxidant activity and phenolic content of seed, skin and pulp parts of 22 grape (*Vitis Vinifera*) cultrivars (4 common and 18 registered or candidate for registration). Journal of Food Processing and Preservation 39:1682-1691 (2015).
- 47 Corrales M, Toepfl S, Butz P, Knorr D, Tauscher B, Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison, Innovative. Food Science and Emerging Technologies 9:85-91 (2008).
- 48 Centeno MRG, Serra FC, Femenia A, Rosselló C, Sima S, 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 22:506-514 (2015).

## Figure Legends

Fig. 1 Chromatogram obtained by HPLC-UVis for the twelve standards tested.

Fig. 2 Spectrum of HRMS for ultrasound extract carried-out with hexane in ESI(-) mode.

Fig. 3 The chemical structure of compounds identified in extracts of grape juice by-products by HRMS.

Fig. 1

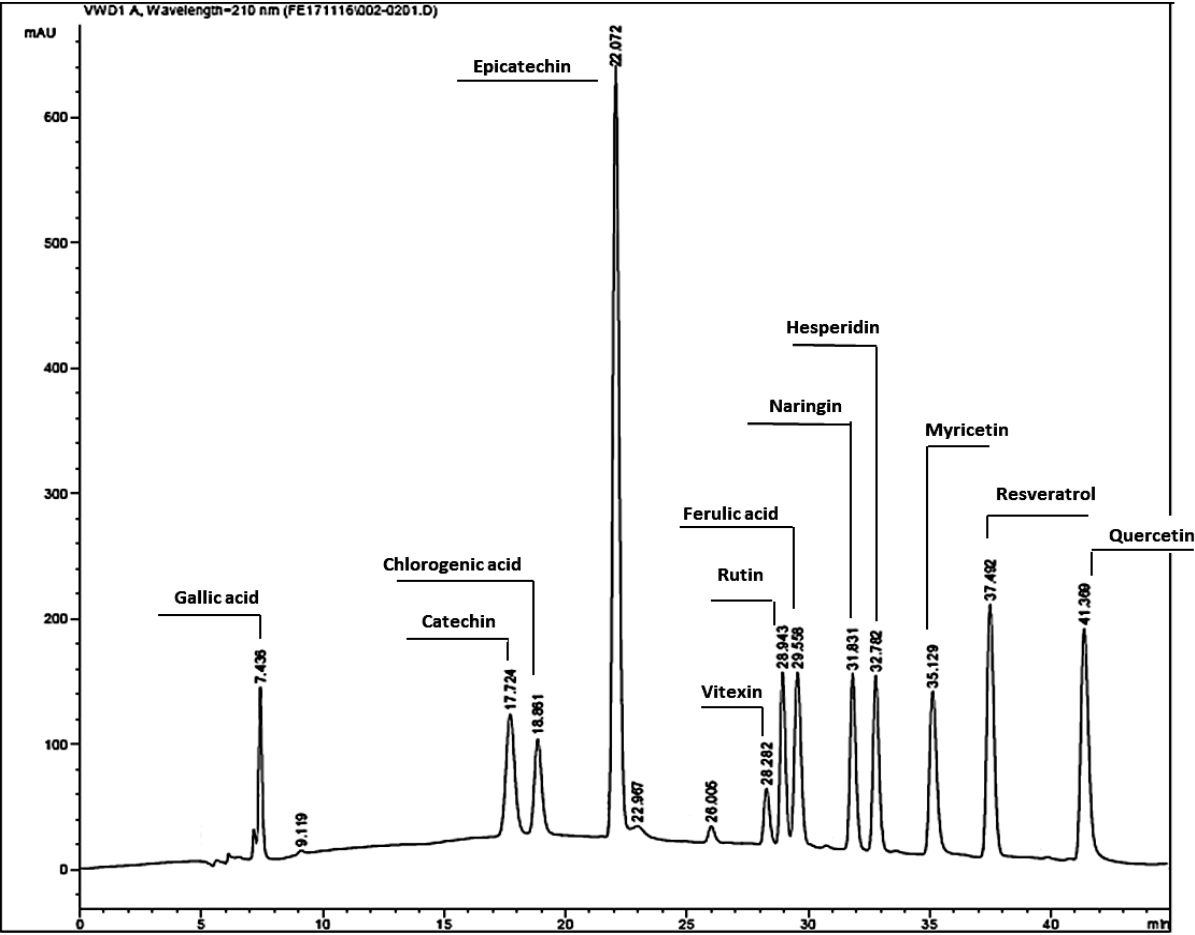


Fig. 2

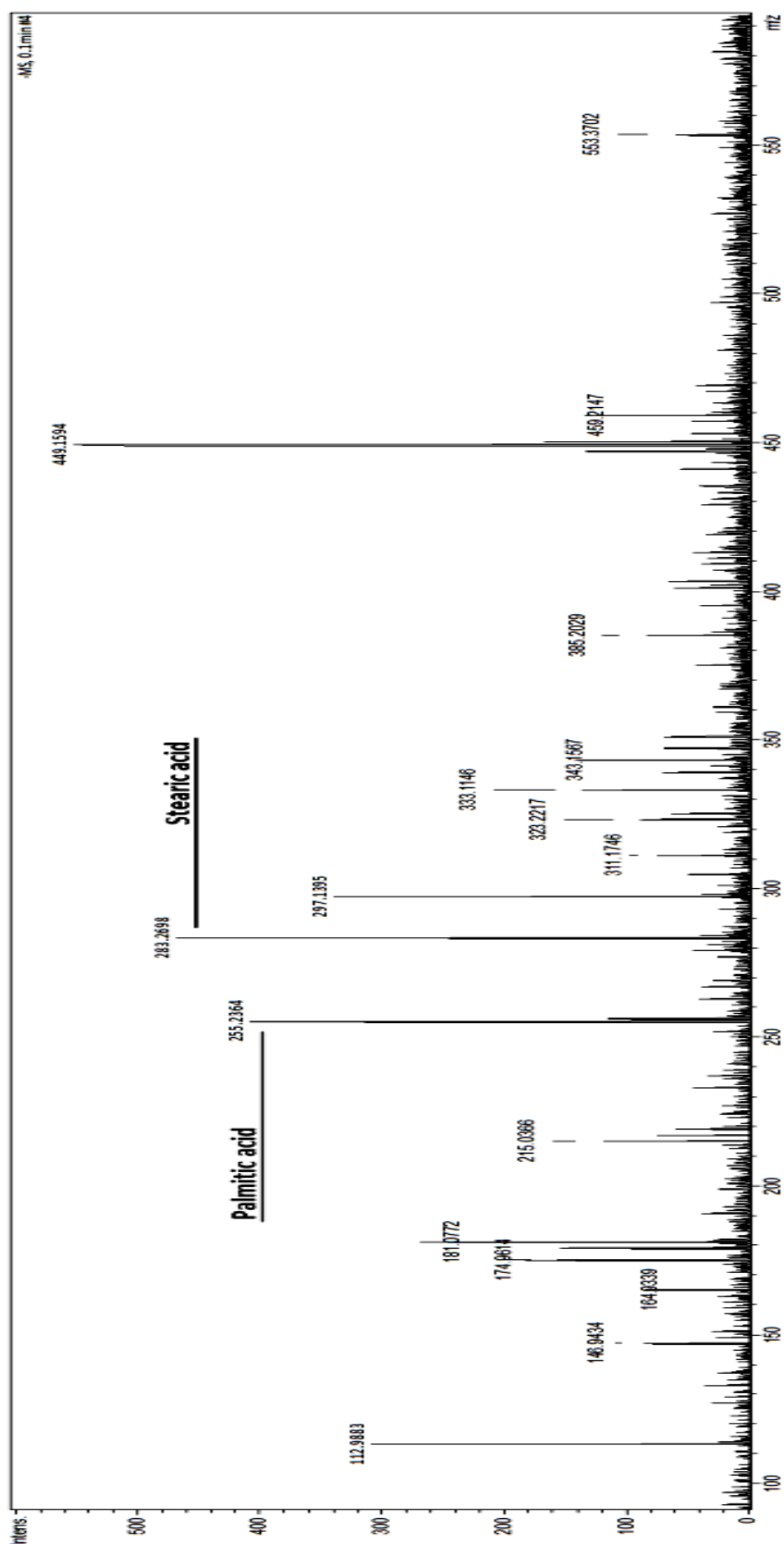
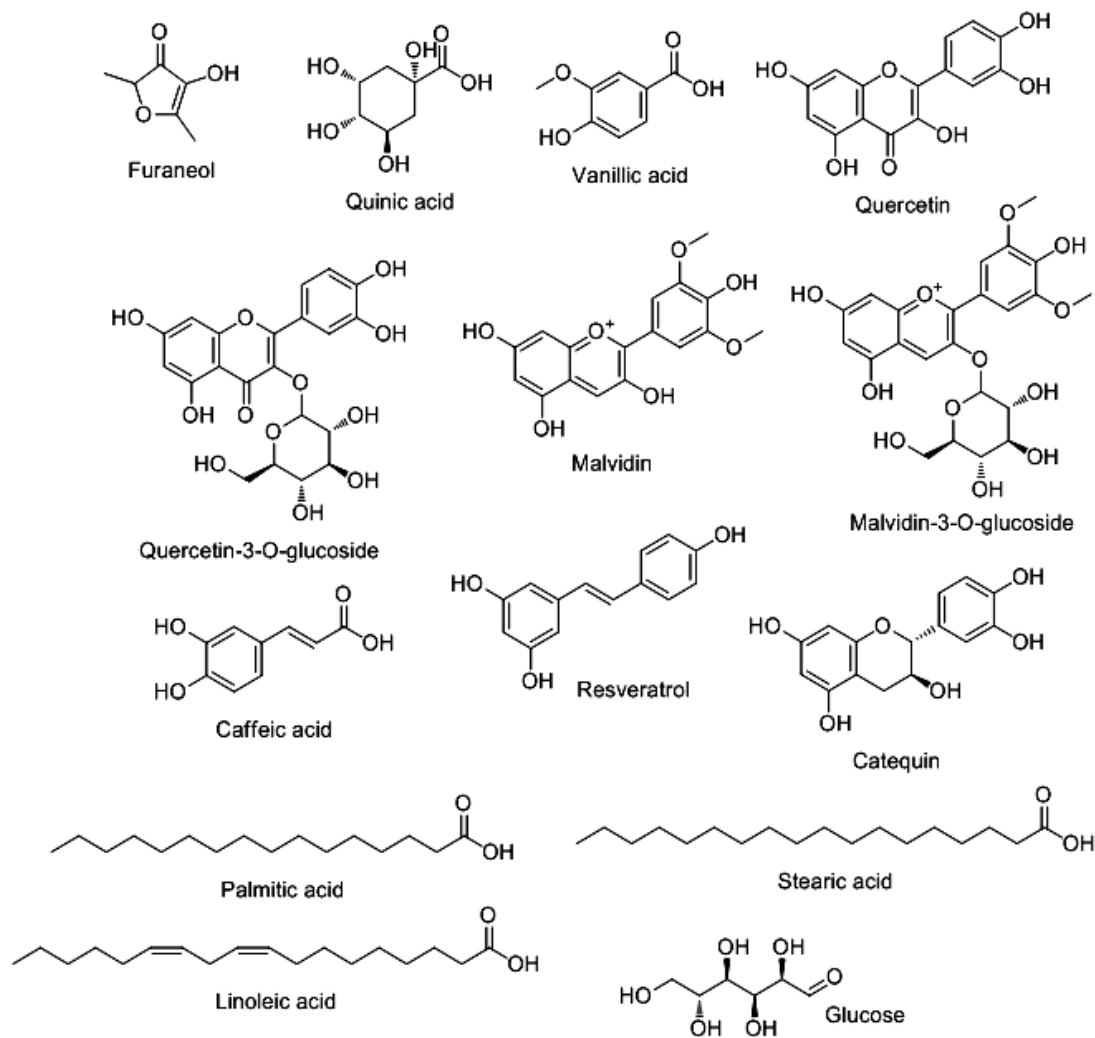


Fig. 3



## Tables

Table 1 Yields (%) related to the methods of extracting of winery by-products.

Table 2 Parameters of the HPLC-UVis method for the evaluated compounds.

Table 3 Polyphenolic composition of extracts studied (mg/Kg).

Table 4 Polyphenolic composition of fractions studied (µg/mL).

Table 5 Chemical compounds identified in *V. labrusca* extracts by high resolution mass spectrometry, in positive and negative mode.

Table 6 The crude extracts antioxidant capacity determinated by DPPH<sup>·</sup> method.

Table 7 Content (%) of total phenolic compounds mg GAE/100g gallic acid.



Table 1

| Method/Solvents                                       | Hexane       | Chloroform   | Ethyl acetate | Ethanol      | Water        |
|-------------------------------------------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
| Liquid-liquid                                         | 0.64 ± 0.02% | 0.15 ± 0.03% | 0.21 ± 0.01%  | 0.47 ± 0.05% | 0.44 ± 0.02% |
| Ultrasound                                            | 0.23 ± 0.05% | 0.15 ± 0.03% | 0.24 ± 0.02%  | 1.03 ± 0.01% | 0.65 ± 0.05% |
| Microwave                                             | 4.15 ± 0.04% | 4.68 ± 0.01% | 0.45 ± 0.02%  | 2.06 ± 0.03% | 3.12 ± 0.04% |
| Data are expressed as mean ± standard deviation (n=3) |              |              |               |              |              |

Table 2

| Standarts        | R <sup>2</sup> | Line equation         | LOD<br>(µg/mL) | LOQ<br>(µg/mL) |
|------------------|----------------|-----------------------|----------------|----------------|
| Chlorogenic acid | 0.9932         | $y = 12.14x - 16.49$  | 0.15           | 0.50           |
| Ferulic acid     | 0.9990         | $y = 113.61x - 11.98$ | 0.03           | 0.11           |
| Gallic acid      | 0.9999         | $y = 69.95x + 0.66$   | 0.03           | 0.10           |
| Catechin         | 0.9982         | $y = 179.43x - 30.56$ | 0.02           | 0.06           |
| Epicatequina     | 0.9995         | $y = 123.22x - 54.57$ | 0.04           | 0.09           |
| Hesperidin       | 0.9993         | $y = 40.76x + 4.50$   | 0.02           | 0.08           |
| Myricetin        | 0.9972         | $y = 105.82x - 64.59$ | 0.05           | 0.18           |
| Naringin         | 0.9926         | $y = 55.59x + 45.30$  | 0.03           | 0.09           |
| Quercetin        | 0.9999         | $y = 64.11x - 0.68$   | 0.04           | 0.12           |
| Resveratrol      | 0.9999         | $y = 63.76x + 0.27$   | 0.03           | 0.10           |
| Rutin            | 0.9996         | $y = 29.71x + 1.19$   | 0.04           | 0.12           |
| Vitixin          | 0.9972         | $y = 38.89x + 1.62$   | 0.06           | 0.19           |

Table 3

| Entry/Solvent        | Hexane                     | Chloroform                 | Ethyl acetate              | Ethanol                    | Water                      |
|----------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>Liquid-Liquid</b> |                            |                            |                            |                            |                            |
| Catechin             | Nd                         | Nd                         | Nd                         | Nd                         | Nd                         |
| Resveratrol          | Nd                         | Nd                         | Nd                         | 0.94 ± 0.06 <sup>Ab</sup>  | Nd                         |
| Hesperidin           | Nd                         | Nd                         | Nd                         | 0.59 ± 0.07 <sup>Ab</sup>  | Nd                         |
| Gallic acid          | 2.03 ± 0.04 <sup>Bb</sup>  | 0.04 ± 0.001 <sup>Cb</sup> | 0.04 ± 0.001 <sup>Cb</sup> | 3.25 ± 0.13 <sup>Ac</sup>  | 1.94 ± 0.03 <sup>Bc</sup>  |
| Epicatechin          | Nd                         | Nd                         | Nd                         | Nd                         | Nd                         |
| Naringin             | 1.72 ± 0.06 <sup>Ab</sup>  | 0.01 ± 0.002 <sup>Ca</sup> | 0.02 ± 0.001 <sup>Cb</sup> | 0.28 ± 0.07 <sup>Bb</sup>  | 0.31 ± 0.04 <sup>Bb</sup>  |
| <b>Ultrasound</b>    |                            |                            |                            |                            |                            |
| Catechin             | Nd                         | Nd                         | Nd                         | Nd                         | Nd                         |
| Resveratrol          | Nd                         | Nd                         | Nd                         | Nd                         | Nd                         |
| Hesperidin           | Nd                         | 0.02 ± 0.002 <sup>Ca</sup> | 0.16 ± 0.01 <sup>Bb</sup>  | 0.50 ± 0.06 <sup>Ab</sup>  | Nd                         |
| Gallic acid          | 0.08 ± 0.003 <sup>Dc</sup> | 0.08 ± 0.003 <sup>Db</sup> | 0.23 ± 0.002 <sup>Cb</sup> | 4.10 ± 0.03 <sup>Bb</sup>  | 5.01 ± 0.12 <sup>Ab</sup>  |
| Epicatechin          | Nd                         | Nd                         | 0.06 ± 0.002 <sup>Ab</sup> | Nd                         | Nd                         |
| Naringin             | 0.04 ± 0.003 <sup>Bc</sup> | 0.02 ± 0.003 <sup>Ba</sup> | 0.04 ± 0.003 <sup>Bb</sup> | 0.50 ± 0.08 <sup>Ab</sup>  | 0.45 ± 0.08 <sup>Ab</sup>  |
| <b>Microwave</b>     |                            |                            |                            |                            |                            |
| Catechin             | Nd                         | Nd                         | 1.40 ± 0.04 <sup>Aa</sup>  | Nd                         | Nd                         |
| Resveratrol          | Nd                         | Nd                         | 1.17 ± 0.05 <sup>Ba</sup>  | 7.59 ± 0.49 <sup>Aa</sup>  | Nd                         |
| Hesperidin           | Nd                         | Nd                         | 0.62 ± 0.09 <sup>Ba</sup>  | 3.16 ± 0.23 <sup>Aa</sup>  | Nd                         |
| Gallic acid          | 15.41 ± 0.48 <sup>Da</sup> | 16.44 ± 0.39 <sup>Ca</sup> | 1.74 ± 0.04 <sup>Ea</sup>  | 33.87 ± 0.37 <sup>Aa</sup> | 24.98 ± 0.29 <sup>Ba</sup> |
| Epicatechin          | Nd                         | 12.29 ± 0.16 <sup>Aa</sup> | 1.14 ± 0.04 <sup>Ca</sup>  | 5.24 ± 0.25 <sup>Ba</sup>  | Nd                         |
| Naringin             | 5.55 ± 0.64 <sup>Aa</sup>  | Nd                         | 0.27 ± 0.05 <sup>Da</sup>  | 1.37 ± 0.31 <sup>Ca</sup>  | 3.41 ± 0.55 <sup>Ba</sup>  |

Averages followed by the same letter do not differ significantly from each other by the Tukey test at 0.05%. Lowercase letters correspond to the columns between the same compound and uppercase to the rows.

Table 4

| Entry/Fraction | F1                        | F2                       | F3                       | F4                       | F5                       | F6                        |
|----------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Catechin       | Nd                        | Nd                       | Nd                       | Nd                       | Nd                       | Nd                        |
| Resveratrol    | Nd                        | Nd                       | Nd                       | Nd                       | 1.38 ± 0.06 <sup>c</sup> | 1.50 ± 0.09 <sup>c</sup>  |
| Gallic acid    | 1.35 ± 0.07 <sup>h</sup>  | 1.46 ± 0.06 <sup>h</sup> | 1.76 ± 0.07 <sup>g</sup> | 2.65 ± 0.03 <sup>e</sup> | 2.95 ± 0.02 <sup>d</sup> | 3.04 ± 0.05 <sup>b</sup>  |
|                | F7                        | F8                       | F9                       | F10                      | F11                      | F12                       |
| Catechin       | Nd                        | Nd                       | 1.69 ± 0.07 <sup>a</sup> | 0.48 ± 0.02 <sup>b</sup> | Nd                       | Nd                        |
| Resveratrol    | 5.89 ± 0.14 <sup>a</sup>  | 1.68 ± 0.03 <sup>b</sup> | 1.18 ± 0.07 <sup>d</sup> | Nd                       | Nd                       | Nd                        |
| Gallic acid    | 3.24 ± 0.04 <sup>bc</sup> | 3.78 ± 0.06 <sup>a</sup> | 2.54 ± 0.05 <sup>e</sup> | 2.60 ± 0.05 <sup>e</sup> | 2.18 ± 0.11 <sup>f</sup> | 3.07 ± 0.06 <sup>cd</sup> |

Averages followed by the same letter do not differ significantly from each other by the Tukey test at 0.05%.

Table 5

| Entry                                                                                                       | Precursor ion $m/z$ | Extract | Method | Identification                   | Elem. Comp.                                     | Diff. ppm | Ref.                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------|--------|----------------------------------|-------------------------------------------------|-----------|------------------------------|
| <b>Analysis in ESI(+): Hexane (A); Chloroform (B); Ethyl acetate (C); Ethanol (D); Water (E);</b>           |                     |         |        |                                  |                                                 |           |                              |
| <b>Ultrasound (1); Microwave (2); Column (3); Liquid-liquid (4).</b>                                        |                     |         |        |                                  |                                                 |           |                              |
| 1                                                                                                           | 129.0546            | A-E     | 1-4    | Furaneol                         | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>    | 4.41      | Sasaki et al. <sup>38</sup>  |
| 2                                                                                                           | 169.0496            | A-E     | 1;2;4  | Vanillic acid                    | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>    | 2.86      | Ribeiro et al. <sup>30</sup> |
| 3                                                                                                           | 193.0725            | E       | 4      | Quinic acid                      | C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>   | 5.06      | Silva et al. <sup>39</sup>   |
| 4                                                                                                           | 181.0496            | D-E     | 1;2;4  | Caffeic acid                     | C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>    | 2.67      | Ribeiro et al. <sup>30</sup> |
| 5                                                                                                           | 229.0885            | B       | 1      | Resveratrol                      | C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>  | 4.86      | Koyama et al. <sup>40</sup>  |
| 6                                                                                                           | 291.0855            | D-E     | 1;4    | Catechin/Epicatechin             | C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>  | 4.68      | Ribeiro et al. <sup>30</sup> |
| 7                                                                                                           | 303.0506            | C-D     | 1;2    | Quercetin                        | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>  | 0.40      | Ribeiro et al. <sup>30</sup> |
| 8                                                                                                           | 331.0810            | E       | 1      | Malvidin                         | C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> O <sub>7</sub>  | 2.35      | Koyama et al. <sup>40</sup>  |
| 9                                                                                                           | 465.1008            | C-D     | 1      | Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> | 5.38      | Koyama et al. <sup>40</sup>  |
| 10                                                                                                          | 493.1360            | D-E     | 1;2    | Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside  | C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub> | 2.84      | Koyama et al. <sup>40</sup>  |
| <b>Extracts analysis in negative mode ESI(-): Hexane (A); Chloroform (B); Ethyl acetate (C); Water (E);</b> |                     |         |        |                                  |                                                 |           |                              |
| <b>Ultrasound (1); Microwave (2); Column (3); Liquid-liquid (4).</b>                                        |                     |         |        |                                  |                                                 |           |                              |
| 11                                                                                                          | 179.0558            | A;D-E   | 1-4    | Glucose                          | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>   | 1.32      | Kurt et al. <sup>41</sup>    |
| 11                                                                                                          | 255.2364            | A-E     | 1-3    | Palmitic acid                    | C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>  | 4.41      | Ribeiro et al. <sup>30</sup> |
| 13                                                                                                          | 279.2340            | C-D     | 1-3    | Linoleic acid                    | C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>  | 5.71      | Ribeiro et al. <sup>30</sup> |
| 12                                                                                                          | 283.2698            | A-C     | 1-4    | Stearic acid                     | C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>  | 4.22      | Ribeiro et al. <sup>30</sup> |

Table 6

| Solvents             | Liquid-Liquid               | Ultrasound                 | Microwave                  |
|----------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>Hexane</b>        | 14.87 ± 7.01 <sup>Ab</sup>  | 16.59 ± 5.79 <sup>Ab</sup> | 20.26 ± 1.22 <sup>Aa</sup> |
| <b>Chloroform</b>    | 19.61 ± 7.01 <sup>Ab</sup>  | 17.03 ± 0.30 <sup>Ab</sup> | 17.89 ± 2.74 <sup>Ab</sup> |
| <b>Ethyl acetate</b> | 33.62 ± 0.61 <sup>Ba</sup>  | 74.22 ± 2.07 <sup>Aa</sup> | 31.03 ± 6.71 <sup>Ba</sup> |
| <b>Ethanol</b>       | 29.53 ± 3.96 <sup>Aab</sup> | 31.47 ± 1.22 <sup>Ab</sup> | 36.64 ± 2.44 <sup>Aa</sup> |
| <b>Water</b>         | 14.22 ± 3.05 <sup>Bb</sup>  | 28.66 ± 7.62 <sup>Ab</sup> | 27.59 ± 1.22 <sup>Aa</sup> |

Averages followed by the same letter do not differ significantly from each other by the Tukey test at 0.05%. Capital letters represent statistical differences between extraction methods, lowercase letters represent significant differences between solvents.

Table 7

| Solvents             | Liquid-Liquid         | Ultrasound            | Microwave              |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| <b>Hexane</b>        | $3.58 \pm 0.25^{Bb}$  | $0.05 \pm 0.002^{Cb}$ | $31.76 \pm 0.66^{Ca}$  |
| <b>Chloroform</b>    | $0.09 \pm 0.005^{Db}$ | $0.07 \pm 0.007^{Cb}$ | $107.03 \pm 6.02^{Aa}$ |
| <b>Ethyl acetate</b> | $0.15 \pm 0.003^{Cb}$ | $0.92 \pm 0.006^{Bb}$ | $13.18 \pm 0.04^{Ea}$  |
| <b>Ethanol</b>       | $12.75 \pm 0.39^{Ab}$ | $6.17 \pm 0.20^{Ac}$  | $73.33 \pm 2.45^{Ba}$  |
| <b>Water</b>         | $10.23 \pm 0.63^{Ab}$ | $5.31 \pm 0.56^{Ac}$  | $26.15 \pm 1.29^{Da}$  |

Averages followed by the same letter do not differ significantly from each other by the Tukey test at 0.05%. Capital letters represent statistical differences between extraction methods, lowercase letters represent significant differences between solvents.

## 5 DISCUSSÃO GERAL

Nas últimas décadas ocorreu um grande crescimento demográfico, e com isso surgiu a necessidade da expansão industrial para atender a demanda por alimentos e medicamentos. Dentro desse contexto há uma preocupação com o excesso de resíduos industriais descartados no meio ambiente. Entre estes segmentos destaca-se o setor vitivinícola, que está entre as indústrias que mais produzem resíduos orgânicos. Portanto existe uma necessidade no desenvolvimento de novas alternativas capazes de transformar estes co-produtos em produtos úteis. Esta biomassa residual apresenta compostos valiosos devido às suas características estruturais, tais como os flavonoides (antocianinas, catequinas, flavonóis), glicosídeos, álcoois, ácidos fenólicos, estilbenos (KAMMERER et al., 2005). Dessa forma, a recuperação destes compostos em extratos, ou frações enriquecidas, podem ter aplicações úteis. Para isso é necessário o aprimoramento dos métodos de extração e purificação, sendo este o principal objetivo deste projeto.

Assim sendo, os resíduos de vinificação foram previamente isolados e submetidos a extrações assistidas por diferentes formas de energia (ultrassom e micro-ondas) e com utilização de solventes de polaridades diferentes (hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e água). Além disso, um processo de prévio isolamento através de coluna aberta com sílica foi testado. A composição química foi avaliada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector UV-Vis (CLAE-UV), Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR). A quantidade de fenólicos totais foi avaliada bem como a capacidade antioxidante através dos métodos de Folin-Ciocalteu e DPPH respectivamente.

A extração é um passo importante na recuperação, isolamento e identificação de compostos. A variação e intensidade de energia, polaridade dos solventes, pH dos sistemas, entre outras características, são essenciais para o isolamento de um composto ou grupo a partir de misturas complexas.

O método conhecido como líquido-líquido, onde é possível fazer variações de solventes, pH, entre outros parâmetros, é a forma mais utilizada para extração de compostos. Por conta das facilidades de operação e a não necessidade de equipamentos especiais, esta tem sido a técnica mais utilizada para a produção de extratos de produtos naturais (MENDOZA et al., 2013).

Em outro caminho, a extração assistida por ultrassom tem sido implementada para melhorar a eficiência da extração de fenólicos, açúcares e minerais. Isto ocorre porque a energia facilita o rompimento das células liberando os metabolitos secundários. Sendo assim,



o processo de extração é normalmente mais rápido, com baixo consumo de solvente, é mais reprodutível, sendo possível controlar e fazer gradiente de potência. O fenômeno responsável pelo processo de extração é chamado de cavitação (BARBA et al., 2016).

Da mesma forma, a extração assistida por micro-ondas destaca vantagens como: viabilidade no uso do processo em escala industrial, apresenta aquecimento mais homogêneo e rápido sendo possível fazer gradientes térmicos. Este método tem sido utilizado para a extração de compostos orgânicos em geral, principalmente aromáticos.

De acordo com os objetivos, comparou-se as técnicas de extração: (i) Líquido-Líquido; (ii) Assistida por ultrassom; e (iii) Assistida por micro-ondas, com variações de solventes para resíduo de vinificação. Assim, as extrações com ultrassom e líquido-líquido obtiveram rendimentos semelhantes às realizadas em solventes polares como etanol ( $0,05 \pm 0,47\%$  e  $0,01 \pm 1,03\%$ ) e água ( $0,02 \pm 0,44\%$  e  $0,05 \pm 0,65\%$ ) e apolares hexano ( $0,02 \pm 0,64\%$  e  $0,05 \pm 0,23\%$ ). Enquanto isso, com a utilização de micro-ondas o maior rendimento foi obtido com clorofórmio ( $0,01 \pm 4,68\%$ ).

Para a qualificação e quantificação dos componentes dos extratos e frações utilizou-se CLAE-UV, EMAR e a determinação de fenólicos totais via técnica de Folin-Ciocalteu. Na primeira foi utilizado um método já otimizado para a determinação de flavanoides, o qual é baseado em trabalho de Morelli (2010), onde são analisados 12 padrões simultaneamente (ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, epicatequina, rutina, ácido ferúlico, naringina, hesperidina, miricetina, resveratrol, quercetina e vitexina). Destes 12 avaliados, foram identificados 6 nos extratos, catequina, resveratrol, hesperidina, ácido galico, epicatequina.

Os compostos ácido gálico e naringina foram identificados em todas as extrações (micro-ondas, ultrassom e líquido-líquido) e solventes (hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e água), apresentando maiores valores na extração micro-ondas: entre  $0,37 \pm 33,87\text{mg/Kg}$  ácido gálico e  $0,64 \pm 5,55\text{mg/Kg}$  naringina. Ainda, na extração assistida por micro-ondas o resveratrol foi prevalente nos solventes etanol e acetato de etila variando entre 1,17 a  $7,59\text{mg/Kg}$ . Da mesma forma destacou-se que este último processo foi o que mais extraiu compostos fenólicos.

Com a finalidade de obtenção de extratos enriquecidos em compostos fenólicos, os resíduos de vinificação foram fracionados com auxílio de coluna aberta utilizando sílica como fase estacionária e solventes de polaridades diferentes (clorofórmio, acetato de etila e metanol). Este é o mesmo método adotado por Nugroho et al. (2016) para o isolamento e obtenção de compostos fenólicos de folhas da espécie *Carica papaya*.

A partir do resíduo fresco foram obtidas 255 frações, as quais foram analisadas por cromatografia de camada delgada, sendo visualizadas sob luz UV a 254 e 365nm, e também coradas com spray de ácido sulfúrico-vanilina e aquecimento adicional. Assim, elas foram unidas por similaridade em 12 diferentes frações. Após, estas frações foram avaliadas por CLAE-UV sendo determinada a presença de 3 compostos (catequina, resveratrol e ácido gálico) em diferentes concentrações. Enquanto todas as frações apresentaram ácido gálico na sua constituição em concentrações variando entre  $0,07^h \pm 1,35$  a  $0,06^a \pm 3,78\text{mg/Kg}$ , o resveratrol ( $0,07^d \pm 1,18$  a  $0,14^a \pm 5,89\text{mg/Kg}$ ) foi identificado nas frações obtidas com clorofórmio e acetato de etila. Dessa forma foi possível avaliar que este método pode ser utilizado para enriquecimento de frações em determinados compostos como, por exemplo, resveratrol.

Com a intenção de uma qualificação mais ampla da composição química, os extratos e frações foram avaliados também por EMAR como ionização por electrospray (ESI). Esta técnica tem sido amplamente utilizada para identificação de compostos fenólicos em misturas complexas, como são os extratos de plantas, por exemplo, fenólicos (RUFATTO et al., 2013) e alcaloides (NICOLA et al., 2013) em mistura complexa como extratos. Aqui identificou-se 14 compostos, em ambos os modos ESI(+) e ESI(-) como: furaneol, ácido quinico, ácido vanílico, ácido cafeico, resveratrol, catequina, malvidina, quercetina-3-O-glucosideo, malvidina-3-O-glucosideo, glucose, ácido palmítico, ácido linoleico, ácido esteárico. Destaca-se que a extração assistida por ultrassom apresentou 13 destes 14 compostos, com destaque para os compostos glicosilados (quercetina-3-O-glucosideo). Estes compostos são conhecidos como inibidores de enzimas como fosfolipases A2 e C, tirosina quinases, lipoxigenases, entre outras, sendo responsáveis por atividades anti-inflamatória, anti-histamínica e até citotóxica (WOLFFRAM et al., 2002).

Neste estudo, a análise de compostos fenólicos totais foi realizada através do método desenvolvido por Folin-Ciocalteu. Roesler et al. (2007) faz uma comparação direta do extrato com um padrão (ácido gálico) utilizando um espectrofotômetro. O teste estatístico ANOVA foi aplicado nos resultados para verificar diferenças significativas nas amostras. Os resultados obtidos na extração por ultrassom foram inferiores aos obtidos nas extrações micro-ondas e líquido-líquido, com variação entre  $(0,002^{Cb} \pm 0,05$  a  $0,20^{Ac} \pm 6,17 \text{ mg GAE/100g})$ . No entanto, a extração micro-ondas apresentou melhores resultados, entre  $0,04 \pm 13,18$  a  $6,02 \pm 107,03\text{mg GAE/100g}$ . Ao se comparar os métodos de extração, obteve-se o conteúdo de compostos fenólicos totais que foram de  $0,002 \pm 0,05\text{mg/GAE/100g}$  a  $6,02 \pm 107,03\text{mg/GAE/100g}$ . Casas e col. (2015) e Corrales e col. (2008) utilizaram este método para

análise de fenólicos totais em extratos de resíduos de vinificação. Seus resultados foram similares (entre  $0,20 \pm 6,17$  a  $1,22 \pm 31,47$ ) aos obtidos aqui, confirmado que estes subprodutos são ricos em compostos fenólicos. Ainda, a avaliação de compostos fenólicos totais demonstra que existe uma variação expressiva entre os extratos.

Como exemplo, o extrato com solvente clorofórmio, na extração micro-ondas, apresentou alta quantidade de compostos fenólicos  $6,02 \pm 107,03$ mg GAE/100g, mas poucos compostos no CLAE-UV entre  $0,16 \pm 12,29$  a  $0,39 \pm 16,44$ mg/Kg.

Muitos destes compostos podem estar em baixas concentrações e serem mascarados quando presentes em extratos totais. Neste sentido, as extrações e frações podem auxiliar na atividade isolada de cada composto, ou de compostos enriquecidos em amostras.

Neste trabalho optou-se pelo método DPPH<sup>•</sup>, a qual é uma técnica espectrofotométrica que consiste em medir a diminuição da absorvência a 517nm do radical DPPH<sup>•</sup>, provocada pela presença de antioxidantes. Os extratos obtidos com ultrassom foram os que apresentaram maior percentual de inibição radical DPPH<sup>•</sup> ( $2,07 \pm 74,22\%$  para acetato de etila). Enquanto isso, os obtidos com micro-ondas apresentaram o percentual de inibição de  $2,44 \pm 36,64\%$ , utilizando etanol como solvente. Destaca-se ainda que para a extração líquido-líquido o maior percentual em  $0,61 \pm 33,62\%$  de inibição do DPPH<sup>•</sup> foi obtida pelo extrato em acetato de etila. Desta forma, demonstra-se que os extratos obtidos a partir de resíduos de vinificação apresentam boa capacidade de sequestro de radicais livres, conclusões semelhantes às obtidas por outros autores como Kabir e col. (2015) em que seus extratos mostraram um percentual de varredura em torno de 60 e 70%; e para Rajha et al. (2013), o percentual do radical DPPH<sup>•</sup> foi de 11% a 35% para extratos obtidos a partir de resíduos de vinificação com os solventes etanol e água, utilizando a mesma técnica de análise.

## 6 CONCLUSÕES

Os dados obtidos com esse estudo permitem concluir que:

- Resíduos de suco de uva são ricos em compostos fenólicos, principalmente flavonoides;
- Sobre os métodos de extração a partir de subprodutos de uva conclui-se que o método por micro-ondas, usando solventes polares como etanol e água, apresentou o melhor rendimento;

Tirar a frase

- A composição química pode ser determinada pela soma das técnicas: CLAE-UV, EMAR e compostos fenólicos totais;
- Portanto, este trabalho demonstrou que é possível uma utilização mais nobre de resíduos de vinificação, os quais normalmente são descartados no meio ambiente. De acordo com os métodos de extração e solventes é possível determinar frações enriquecidas em diferentes compostos.

## **7 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Como continuidade deste trabalho seria importante:

- Testar novos métodos de extração como sólido-líquido e fluído subcrítico e outras formas de isolamento de compostos químicos.
- Avaliar os compostos químicos identificados quanto a suas propriedades in vivo e in vitro.
- Aplicar os extratos enriquecidos em compostos fenólicos como aditivos em alimentos e cosméticos.

## REFERÊNCIAS

- AKSOYLU, Zeynep; ÇAGINDI, Özlem; KÖSE, Ergun. Effects of blueberry, grape seed powder and poppy seed incorporation on physicochemical and sensory properties of biscuit. **Journal of Food Quality**, 38, 164-174, 2015.
- ALCAIDE, Eduarda Molina; MOUMEN, Abdelmajid; GARCIA, Ignacio Martín. By-products from viticulture and the wine industry: potential as sources of nutrients for ruminants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 88, 597-604, 2008.
- ANASTASIADIA, Maria; PRATSINIS, Harris; KLETSAS, Dimitris; SKALTSOUNIS, Alexios-Leandros; HAROUTOUNIAN, Serkos A. Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their in vitro antioxidant properties.. **Food Science and Technology**, 48, 316-322, 2012.
- ANGELO, Priscila Milene; JORGE, Neuza. Phenolic compounds in foods. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 66(1), 1-9, 2006.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, 4, 426-436, 2013.
- AWAN, A. R.; SHAW, W. M.; ELLIS, T. Biosynthesis of therapeutic natural products using synthetic biology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 105, 2016. Elsevier B.V.
- BAKER, J. T.; BORRIS, R. P.; CARTÉ, B. et al. Natural product drug discovery and development: new perspectives on international collaboration. **Journal of natural products**, v. 58, 9, 1325-1357, 1995.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, 5, 431-441, 2005.
- BARBA, Francisco J.; ZHU, Zhenzhou; KOUBA, Mohamed; SANT'ANA, Anderson de Souza; ORLIEN, Vibeke. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive 1 compounds from winery wastes and by-products: A review, **Trends in Food Science & Technology**, 2016.
- BARROS, Ana; VILAPLANA, Amadeo Gironés; TEIXEIRA, Ana. et al. Evaluation of grape (*Vitis vinífera* L.) stems from Portuguese varieties as a resource of (poly)phenolic compounds: A comparative study. **Food Research International**, 0963-9969, 2014.
- BERTRAN, E.; SORT, X.; SOLIVA, M.; TRILLAS, I. Composting winery waste: sludges and grape stalks. **Bioresource Technology**, 95, 203-208, 2004.
- BIANCHI, Maria de Lourdes Pires; ANTUNES, Lusânia Maria Gregg. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, vol. 12, Universidade de São Paulo, 1999.

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

BORDIGA, Matteo; TRAVAGLIA, Fabiano; LOCATELLI, Monica. et al. Spent grape pomace as a still potential by-product. **International Journal of Food Science and Technology**, 50, 2022-2031, 2015.

BOUDET, A. M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, v. 68, 22-24, 2722-2735, 2007.

BOTTI, Silvia Cândida Corrêa Fernandes. **Extração e caracterização do resveratrol do bagaço de uva, análise comparativa entre métodos de secagem e comprovação da atividade biológica in vitro**. Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, São Paulo, 2016.

CAMARGO, Umberto Almeida. Progressos na Viticultura Brasileira. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, SP, Volume Especial, E. 144-149, 2011.

CAMPOS, Luanda Maria Abreu Silva de. **Obtenção de extratos de bagaço de uva Cabernet Sauvignon (Vitis vinífera):** parâmetros de processo e modelagem matemática. Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

CANALS, R.; LLAUDY, M. C.; VALLS, J.; CANALS, J. M.; ZAMORA, F. Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seeds of tempranillo grapes at different stages of ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, 10, 4019-4025, 2005.

CARDONA, Jorge A.; LEE, Joon-Hee; TALCOTT, Stephen T. Color and Polyphenolic Stability in Extracts Produced from Muscadine Grape (*Vitis rotundifolia*) Pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57, 8421-8425, 2009.

CARERI, Maria; CORRADINI, Claudio; ELVIRI, Lisa. et al. Direct HPLC Analysis of Quercetin and trans-Resveratrol in Red Wine, Grape, and Winemaking Byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 5226-5231, 2003.

CASAS, Marta Alvarez; PÁJARO, Marta; LORES, Marta; JARES, Carmen Garcia. Characterization of grape marcs from native and foreign white varieties grown in northwestern Spain by their polyphenolic composition and antioxidant activity. **European Food Research and Technology**. DOI 10.1007/s00217-015-2573-0, 2015.

CENTENO, María Reyes González; KNOERZER, Kai; SABAREZ, Henry. et al. Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.) – A response surface approach. **Ultrasonics Sonochemistry**, 21, 2176-2184, 2014.

CIEŚLA, Ł.; MOADDEL, R. Comparison of analytical techniques for the identification of bioactive compounds from natural products. **Natural Product Reports**, 2016.

CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A. -G. et al. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, 540-560, 2017.

CLUBE DOS VINHOS. **Fermentar para nascer o vinho**. Disponível em: <<https://www.clubedosvinhos.com.br/fermentar-para-nascer-o-vinho/>> Acesso em: 15 nov. 2016.

CORRALES, M.; TOEPF, S.; BUTZ, P.; KNORR, D.; TAUSCHER, B. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 9, 85-91, 2007.

CRUZ, Ana Paula Gil; FREITAS, Suely Pereira; TORRES, Alexandre Guedes; GOMES, Flávia dos Santos; CABRAL, Lourdes M. C. **Extração de compostos bioativos do bagaço da uva (Vitis vinifera L.)**. Ciências de Alimentos, UFRJ, 2010.

ĆUJIĆ, N.; ŠAVIKIN, K.; JANKOVIĆ, T. et al. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. **Food Chemistry**, v. 194, 135-42, 2016.

DAVID, B.; WOLFENDER, J. -L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, 2, 299-315, 2014.

DELGADO DE LA TORRE, M. P.; FERREIRO-VERA, C.; PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Anthocyanidins, Proanthocyanidins, and Anthocyanins Profiling in Wine Lees by Solid-Phase Extraction–Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry with Data-Dependent Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 61, 12539-12548, 2013.

DÍAZ, Ana Belén; ALVARADO, Octavio; ORY, Ignacio de; CARO, Ildefonso; LANDINO, Ana. Valorization of grape pomace and orange peels: Improved production of hydrolytic enzymes for the clarification of orange juice. **Food and Bioproducts Processing**, 91, 580-586, 2013.

DOMINGUEZ, Jorge; CORDEIRO, Hugo Martínez; CASAS, Marta Álvarez; LORES, Marta. Vermicomposting grape marc yields high quality organic biofertiliser and bioactive polyphenols. **Waste Management & Research**, v. 32(12) 1235-1240, 2016.

FALCONE FERREYRA, M. L.; RIUS, S. P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, 1-15, 2012.

FERNANDEZ, Alicia Gomes. **O processo de vinificação e o conteúdo de antioxidantes**. Universidade Brasília, 2008.

FERRARI, Valdecir. **A sustentabilidade da vitivinicultura através de seus próprios resíduos**. Campos Universitário da Região do Vale dos Vinhedos, Bento Gonçalves, 2010.



FREITAS, Andréia Andrade de; DETONI, Alessandra Maria; CLEMENTE, Edmar; OLIVEIRA, Cláudio Celestino de. Determinação de resveratrol e características químicas em sucos de uvas produzidas em sistemas orgânico e convencional. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 57, 1, 001-005, 2010.

FRIEDMAN, Mendel. Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Properties of Wines and Winery Byproducts in Relation to Their Flavonoid Content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62, 6025-6042, 2014.

FONTANA, Ariel R.; ANTONIOLLI, Andrea; ANTONIOLLI, Rubén Bottini. Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 61 (38), 8987-9003, 2013.

GARCIA-SALAS, P.; MORALES-SOTO, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, v. 15, 12, 8813-8826, 2010.

GRAEBIN, Natália Guilherme. **Recuperação de compostos bioativos de bagaço de uva por cultivos fúngicos em estado sólido comparado ao método de extração sólido-líquido**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

HAJJ, Youssef El; LOUKA, Nicolas; NGUYEN, Catherine; MAROUN, Richard G. Low Cost Process for Phenolic Compounds Extraction from Cabernet Sauvignon Grapes (*Vitis vinífera* L. cv. Cabernet Sauvignon). Optimization by Response Surface Methodology. **Food and Nutrition Sciences**, 3, 89-103, 2012.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Projeções iniciais e variáveis transformadas para o Popclok 2013**. Brasil. Acesso em: 26 fev. 2017.

IBRAVIN – Instituto Brasileiro do Vinho. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/admin/arquivos/estatisticas/1473079559.pdf>> Acesso em: 15 nov. 2016.

IBRAVIN – Instituto Brasileiro do Vinho. **História do vinho do Brasil**. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/Historia-do-Vinho-no-Brasil>> Acesso em: 15 nov. 2016.

KABIR, Faisal; SULTANA, Mosammad Shahin; KURNIANTA, Heri. Polyphenolic Contents and Antioxidant Activities of Underutilized Grape (*Vitis vinifera* L.) Pomace Extracts. **Preventive Nutrition and Food Science**, 20(3), 210-214, 2015.

KAMMERER, Dietmar R.; KAMMERER, Judith; VALET, Regine; CARLE, Reinhold. Recovery of polyphenols from the by-products of plant food processing and application as valuable food ingredients. **Food Research International**, 65, 2-12, 2014.

KHACHA-ANANDA, S.; TRAGOOLPUA, K.; CHANTAWANNAKUL, P.; TRAGOOLPUA, Y. Antioxidant and anti-cancer cell proliferation activity of propolis extracts from two extraction methods. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, 11, 6991-6995, 2013.

KHAN, M. K.; ABERT-VIAN, M.; FABIANO-TIXIER, A. S.; DANGLES, O.; CHEMAT, F. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. **Food Chemistry**, v. 119, 2, 851-858, 2010.

KUREK-GÓRECKA, A.; RZEPECKA-STOJKO, A.; GÓRECKI, M. et al. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. **Molecules**, v. 19, 1, 78-101, 2014.

LOMILLO, Javier García; SANJOSE, Maria Luisa González; GARCÍA, Raquel Del Pino. et al. Antioxidant and Antimicrobial Properties of Wine Byproducts and Their Potential Uses in the Food Industry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62, 12595-12602, 2014.

LOPEZ, María del Mar Castro; VILARIÑO, José Manuel López; RODRÍGUEZ, María Victoria González. Analytical determination of flavonoids aimed to analysis of natural samples and active packaging applications. **Food Chemistry**, 150, 119-127, 2014.

LUZ, Luiza Placidina da. **Estudo do Ultra-som como técnica de extração de carvões e caracterização dos hidrocarbonetos poliaromáticos**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.

MARINO, Matilde Garcia; GONZALO, Julian C. Rivas; IBÁÑEZ, Elena; CONCEPCION, Garcia-Moreno. Recovery of catechins and proanthocyanidins from wineryby-products using subcritical water extraction. **Analytica Chimica Acta**, 563, 44-50, 2005.

MELLO, Loiva Maria Ribeiro. **Desempenho da vitivinicultura brasileira em 2015**. Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/9952204/artigo-desempenho-da-vitivinicultura-brasileira-em-2015>> Acesso em: 15 nov. 2016.

MELO, Priscilla Siqueira; MASSARIOLI, Adna Prado; DENNY, Carina; SANTOS, Luciana Ferracini dos; FRANCHINB, Marcelo; PEREIRA, Giuliano Elias; VIEIRA, Thais Maria Ferreira de Souza; ROSALEN, Pedro Luiz; ALENCAR, Severino Matias de. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, 18, 160-169, 2015.

MELO, Priscilla Siqueira; BERGAMASCHI, Keityane Boone; TIVERON, Ana Paula; MASSARIOLI, Adna Prado; OLDONI, Tatiane Luiza Cadorin; ZANUS, Mauro Celso; PEREIRA, Giuliano Elias; ALENCAR, Severino Matias de. Phenolic composition and antioxidante e activity of agroindustrial residues. **Ciência Rural**, v. 41, 1088-1093, 2011.

MELO, P.; MASSARIOLI, A.; DENNY, C.; SANTOS, F. L.; FRANCHINB, M.; PEREIRA, G. E.; VIEIRA, T.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M. Winery by-products: Extraction optimization, phenol composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, 181, 160-169, 2015.

MENDOZA, Leonora; YAÑEZ, Karen; VIVANCO, Marcela; MELO, Ricardo; COTORAS, Milena. Characterization of extracts from winery by-products with antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Industrial Crops and Products**, 43, 360-364, 2012.

OLIVEIRA, Daniela A.; SALVADOR, Ana Augusta; SMÂNIA JR, Artur; SMÂNIA, Elza F.A.; MARASCHIN, Marcelo; FERREIRA, Sandra R. S. Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinífera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. **Journal of Biotechnology**, 164, 423-432, 2012.

O'SHEA, Norah; ARENDT, Elke K.; GALLAGHER, Eimear. Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 16 (2012) 1-10, 2012.

OZVURAL, Emin Burçin; VURAL, Halil. Which is the best grape seed additive for frankfurters: extract, oil or flour? **Society of Chemical Industry**, 94, 792-797, 2014.

PARAMÁS, Ana M. González; RUANO, Sara Esteban; BUELGA, Celestino Santos; TERESA, Sonia De Pascual; GONZALO, Julian C. Rivas. Flavanol Content and Antioxidant Activity in Winery Byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 234-238, 2004.

PING, Lan; BROSSE, Nicolas; CHRUSCIEL, Laurent; NAVARRETE, Paola; PIZZI, Antonio. Extraction of condensed tannins from grape pomace for use as wood adhesives. **Industrial Crops and Products**, 33, 253-257, 2011.

QUEIROZ, Emerson F.; WOLFENCIER, Jean-Luc; HOSTETTMAN, Kurt; VIEIRA, Paulo C. Princípios Ativos de Plantas Superiores. 2. ed. Série de textos da Escola de Verão em Química. **ISBN**, 978-85-7600-343-4, São Carlos, 2014.

RAJHA, Hiba N.; DARRA, Nada El; VOROBIEV, Eugène; LOUKA, Nicolas; MAROUN, Richard G. An Environment Friendly, Low-Cost Extraction Process of Phenolic Compounds from Grape Byproducts Optimization by Multi-Response Surface Methodology. **Food and Nutrition Sciences**, 4, 650-659, 2013.

REAL, Mauro Corte. **Os bons vinhos do Sul**. 5. ed. Porto Alegre: Sulina, 1981.

REDDY, G. V. Bhaskar; SEN, A. R.; NAIR, Pramod N.; REDDY, K. Sudhakar; REDDY, K. Kondal; KONDAIAH, N. Effects of grape seed extract on the oxidative and microbial stability of restructured mutton slices. **Meat Science**, 95, 288-294, 2013.

ROCKENBACH, Ismael Ivan; SILVA, Graciela Lessa da; RODRIGUES, Eliseu; GONZAGA, VALDEMIRO; Luciano; FETT, Roseane. Antioxidant activity of grape bagasse extracts from Regente and Pinot Noir varieties (*Vitis vinífera*). **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 66(2), 158-163, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

RONDEAU, Pierangelo; GAMBIERA, Francois; JOLIBERT, Franck; BROSSE, Nicolas. Compositions and chemical variability of grape pomaces from French vineyard. **Industrial Crops and Products**, 43, 251- 254, 2012.

RUFATTO, Luciane Corbellini. **Caracterização de metabólitos secundários em guaco** (*Mikania laevigata* Schultz Bip.ex Baker): produção, regulação e atividade antitumoral, Universidade Caxias do Sul, 2012.

SALAS, Patricia Garcia; MORALES-SOTO, Aranzazu; SEGURA-CARRETERO, Antonio; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, Alberto. Phenolic- Compound- Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. **Molecules**, 2010, 15, 8813-8826, Spain, 2010.

SALES, N. F. F.; CRUZ, A. P. G.; CABRAL, L. M. C.; TORRES, A. G. **Capacidade antioxidante de extratos hidro alcoólicos do bagaço de uva tinta**. Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

SELANI, Miriam Mabel. **Extrato de bagaço de uva como antioxidante natural em carne de frango processada e armazenada sob congelamento**. Universidade São Paulo, 2010.

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

SOUZA, Vinicius Bruno. **Creme ou gel a base de sementes e bagaço de uva**. Patente de Invenção, PI 1001372-5 A2, 2011.

SOUZA, Volnei Brito de. **Aproveitamento dos subprodutos de vinificação da uva Bordô (Vitis Labrusca) para obtenção de pigmentos com propriedades funcionais**. Universidade São Paulo, 2013.

SUN, Vivienne Z.; PARAMAN, Ilankovan; RIZVI, Syed S. H. Supercritical Fluid Extrusion of Protein Puff Made with Fruit Pomace and liquid Whey. **Food Bioprocess Technol**, 8, 1707-1715, 2015.

TIWARI, B. K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. Elsevier B.V. **TrAC-Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, 100-109, 2015.

TORRES, Josep Luis; VARELA, Begona; GARCIA, Mariä Teresa; CARILLA, Josep; MATITO, Cecilia; CENTELLES, Josep; CASCANTE, Marta; SORT, Xavier; LBOBET, Andrau. Valorization of Grape (Vitis vinífera) Byproducts. Antioxidant and Biological Properties of Polyphenolic Fractions Differing in Procyanidin Composition and Flavonol Content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 7548-7555, 2002.

TRUSHEVA, B.; TRUNKOVA, D.; BANKOVA, V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. **Chemistry Central journal**, v. 1, 1, 13, 2007.

VILKHU, K.; MAWSON, R.; SIMONS, L.; BATES, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, 2, 161-169, 2008.

WINES OF BRASIL. **Vinho brasileiro**. Disponível em: <<http://www.winesofbrasil.com/pt/brasilian-wine/a-new-experience>>. Acesso em: 15 nov. 2016.

YEO, K. L.; LEO, C. P.; CHAN, D. J. C. Ultrasonic Enhancement on Propolis Extraction at Varied pH and Alcohol Content. **Journal of Food Process Engineering**, v. 38, 6, 562-570, 2015.

YILMAZ, Yusuf; GÖKSEL, Zekiye; ERDOGAN, S. Seçil; Öztürk, AYSUN; ATAK, Arif; ÖZER, Cengiz. Antioxidant Activity and Phenolic Content of Seed, Skin and Pulp Parts of 22 Grape (*Vitis vinífera* L.) Cultivars (4 Common and 18 Registered or Candidate for Registration). **Journal of Food Processing and Preservation**. ISSN 1745-4549, 2014.

YILMAZ, Yusuf; TOLEDO, Romeot. Major Flavonoids in Grape Seeds and Skins: Antioxidant Capacity of Catechin, Epicatechin, and Gallic Acid. *J. Agric. Food Chemistry*, 52, 255-260, 2004.

ZANUS, Mauro Celso. **Panorama da vitivinicultura brasileira**. XV Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia, Embrapa uva e Vinho, Bento Gonçalves-RS, 2015.

ZHANG, H. F.; YANG, X. H.; WANG, Y. Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, 12, 672-688, 2011.

ZHU, Fengmei; DU, Bin; ZHENG, Lihong; LI, Jun. Advance on the bioactivity and potential applications of dietary fibre from grape pomace. **Food Chemistry**, 186 (2015) 207-212, 2014.