



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIA AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

Maiara Arbigaus Bredun

**VALORIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS DA VINIFICAÇÃO (*Vitis Vinifera* L.):
COMPOSIÇÃO BIOATIVA, BIOACESSIBILIDADE *IN VITRO* E POTENCIAL
BIOLÓGICO EM CÉLULAS**

Florianópolis
2024

Maiara Arbigaus Bredun

**VALORIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS DA VINIFICAÇÃO (*Vitis Vinifera* L.):
COMPOSIÇÃO BIOATIVA, BIOACESSIBILIDADE *IN VITRO* E POTENCIAL
BIOLÓGICO EM CÉLULAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência dos Alimentos da Universidade
Federal de Santa Catarina como requisito
parcial para a obtenção do título de Doutora em
Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Vivian Maria Burin.

Florianópolis
2024

Bredun, Maiara Arbigauss

Valorização de subprodutos da vinificação (*Vitis vinifera* L.): composição bioativa, bioacessibilidade in vitro e potencial biológico em células / Maiara Arbigauss Bredun ; orientador, Vivian Maria Burin, 2024.

133 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Subproduto da vinificação. 3. Solvente verde. 4. Antocianinas. 5. Compostos bioativos. I. Burin, Vivian Maria. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Maiara Arbigaus Bredun

**Valorização de subprodutos da vinificação (*Vitis vinifera* L.): composição bioativa,
bioacessibilidade *in vitro* e potencial biológico em células**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 21 de maio de 2024,
pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Ana Carolina Moura de Sena Aquino
Instituto Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Acácio Antônio Ferreira Zielinski,
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Carmen Maria Oliveira Muller
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Isabela Maia Toaldo Fedrigo
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado
adequado para obtenção do título de Doutora em Ciência dos Alimentos.



Documento assinado digitalmente

PEDRO LUIZ MANIQUE BARRETO

Data: 12/08/2024 15:19:54-0300

CPF: ***.693.129-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Documento assinado digitalmente

Vivian Maria Burin

Data: 12/08/2024 15:05:50-0300

CPF: ***.528.930-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Profa. Dra. Vivian Maria Burin
Orientadora

Florianópolis, 2024.

Ao meu querido tio Silvio José Arbighaus (*in memoriam*),
que sempre acreditou em mim, dedico a conquista deste título.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir que tudo fosse possível e por estar sempre comigo me guiando em todos os meus caminhos.

Aos meu pais, Paulo e Sirlene e ao meu irmão Marlon pelo suporte e amor incondicional em absolutamente todos os momentos dessa trajetória. Amo vocês!

À toda minha família que sempre me apoiou e torceu por esse momento. Em especial ao meu tio Silvio José Arbighaus (*in memoriam*), a quem dedico esse trabalho. Sinto o seu orgulho de mim e dessa conquista em todos os meus pensamentos.

Às minhas melhores amigas Andreia “Gaps”, Meri, Monique, Nana e Tainara por me ouvirem incansavelmente ao longo desses anos, por acreditarem em mim e por continuarem aqui apesar de toda a minha ausência. Agradeço à excelente safra de 2018 do Laboratório de Bioquímica de Alimentos: Saionara, Trilícia e Isabela vocês são minhas referências e mesmo de longe sempre se fizeram presentes, agradeço por todo suporte, momentos compartilhados e amizade. Todas vocês são essenciais!

À minha orientadora Dra. Vivian Maria Burin, pelo trabalho inestimável, além de todo suporte e incentivo, reuniões, conversas, ideias e boas discussões.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica de Alimentos e *Biosense* pelo bom convívio, aprendizados, troca de experiências e valiosas amizades. Ao Dr. Gustavo Padilha pelo suporte e auxílio em todas as análises, pelas conversas e trocas de conhecimento diárias. Em especial agradeço à Luana por toda companhia e auxílio em diversos momentos difíceis, mas também pelos momentos bons e divertidos que deixaram essa trajetória mais leve.

Agradeço imensuravelmente à Grez Roberta por todos os incontáveis auxílios de bastidores científicos empenhados comigo (sem aviso prévio, agendamento ou consulta de disponibilidade) e pelos inúmeros momentos no café do laboratório compartilhando uma dieta

riquíssima em bom humor e felicidade, além de todo o *Happy Hour* semanal que tornou essa trajetória muito mais descomplicada e alegre. Muito obrigada!

Aos Laboratórios do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos (PPGCAL) pela infraestrutura, à professora Dra. Elane Prudêncio, à professora Dra. Carmém Muller e ao professor Dr. Acácio Zielinski pela inestimável contribuição neste trabalho. Ao Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia de Extração Supercrítica (LATESC), à toda equipe, em especial a Renata que me auxiliou em diversas análises e experimentos. Agradeço a Amanda pelo auxílio nas análises de crioconcentração e a Suliana pelo auxílio nas análises de secagem, obrigada por todo o suporte.

Aos membros da banca pela disponibilidade e valiosas contribuições.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos (PPGCAL - UFSC) pelos conhecimentos transmitidos.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida e ao PPGCAL e Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pela infraestrutura;

A todos que contribuíram com o desenvolvimento dessa pesquisa. Obrigada!

"If there is a future, it will be Green"

(Petra Kelly)

RESUMO

O processo de vinificação gera grandes quantidades de subprodutos. A recuperação de compostos bioativos a partir de subprodutos e sua posterior aplicação representa uma oportunidade de mercado promissora para os vitivinicultores e para a indústria de alimentos e pode contribuir para o desenvolvimento sustentável do setor. O objetivo deste trabalho foi aplicar tecnologias de extração e concentração para recuperar os compostos bioativos presentes no bagaço de uva e borra de vinho (*Vitis vinifera* L.). O processo de extração verde foi otimizado para recuperar antocianinas provenientes do bagaço de uva, seguindo um planejamento central composto, onde as variáveis independentes foram volume de solvente (água: solução de ácido cítrico (v/v)), tempo (min) e pH do solvente. O teor de antocianinas monoméricas totais foi a variável dependente utilizada na otimização. O extrato com maior concentração de antocianinas obtido na otimização da extração foi aplicado no processo de crioconcentração em blocos gravitacional. As frações concentradas e o extrato inicial, foram caracterizados quanto à concentração de compostos bioativos e composição físico-química. As amostras de borra de vinho foram desidratadas em estufa com circulação de ar e avaliada quanto à cinética de secagem utilizando curvas de secagem a 40 °C. Após o processo de secagem, quatro métodos de extração: agitador orbital, ultrassom, agitação térmica e extração por líquido pressurizado foram aplicados para recuperação de antocianinas da borra de vinho seca. Um planejamento central composto foi aplicado para a extração por líquido pressurizado, onde as variáveis independentes foram temperatura (°C) e proporção de solvente (etanol: solução de ácido cítrico 0,1 mol/L (v/v)) e a variável resposta foi o teor de antocianinas monoméricas totais. O extrato da borra de vinho obtido através da otimização foi caracterizado quanto ao perfil fenólico e à bioacessibilidade das antocianinas após simulação gastrointestinal *in vitro*. Além disso, a atividade antiproliferativa *in vitro* do extrato foi avaliada. Como resultados deste trabalho observou-se como resposta máxima para extração de antocianinas do bagaço de uva o volume de 10 mL de solução de água:ácido cítrico, em pH de 1,8. A aplicação de crioconcentração no extrato de bagaço de uva demonstrou ser um método eficaz para concentração de compostos bioativos. Após três estágios de concentração, sólidos totais, fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais foram aproximadamente 5 vezes superiores à condição inicial do extrato. O aumento na concentração de compostos bioativos atingiu uma eficiência de processo de 93,11% (estágio 1) para compostos fenólicos e 90,63% (estágio 2) para as antocianinas totais. Considerado os resultados obtidos, conclui-se que a crioconcentração é uma opção promissora para o extrato do bagaço de uva, que pode ser otimizado para preservar e concentrar os compostos bioativos deste subproduto. Com relação às borras de vinho, observou-se que o processo de desidratação convectiva a 40 °C, durante 420 minutos de secagem removeu 88% de água da amostra. Dentre os diferentes métodos de extração, observou-se que a extração por líquido pressurizado em modo estático apresentou maior teor de antocianinas monoméricas totais no extrato e suas as condições de extração e foram otimizadas para obtenção de um extrato rico em antocianinas provenientes da borra do vinho, com a temperatura de 55°C, e o solvente etanol:ácido cítrico 0,1 mol/L utilizado na proporção de 50:50 v/v. As antocianinas delfinidina-3-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo foram identificadas e devidamente quantificadas, sendo a malvidina a majoritária na borra do vinho. Durante a digestão *in vitro*, mudanças importantes foram observadas nas concentrações de antocianinas após a passagem pelas fases gástrica e intestinal. A análise de digestão *in vitro* do extrato da borra de vinho mostrou que todas as antocianinas são bioacessíveis na fase oral e na fase gástrica da digestão gastrointestinal simulada, no entanto na fase intestinal apenas a delfinidina-3-glicosídeo e a malvidina-3-glicosídeo são bioacessíveis. Além disso o extrato não apresentou citotoxicidade para viabilidade celular de fibroblastos murinos (L929) na concentração de 500 µg/mL de extrato da borra de vinho e apresentou

citoproteção (500 µg/mL) quando submetidos ao estresse oxidativo com H₂O₂. Os resultados evidenciam o potencial dos subprodutos de vinificação tanto do ponto de vista tecnológico como corante natural e quando do ponto de vista da saúde como ingrediente de produtos nutracêuticos.

Palavras-chave: Bagaço de uva; Borra de vinho; Solvente verde; Extração por líquido pressurizado; Corante natural; Atividade antiproliferativa.

ABSTRACT

The winemaking process generates large amounts of by-products. The recovery of bioactive compounds from by-products and their subsequent application represents a promising market opportunity for winegrowers and the food industry, providing the sustainable development of the sector. The aim of this work was to apply extraction and concentration technologies to recover the bioactive compounds present in grape pomace and wine lees (*Vitis vinifera* L.). The green extraction process was optimized to recover anthocyanins from grape pomace, following a central composite design, where the independent variables were solvent volume (water: citric acid solution (v/v)), time (min) and solvent pH. The content of total monomeric anthocyanins was the dependent variable used in the optimization. The extract with the highest concentration of anthocyanins obtained in the optimization of the extraction was applied in the process of cryoconcentration in gravitational blocks. The concentrated fractions and the initial extract were characterized according to the concentration of bioactive compounds and physicochemical composition. Wine grounds samples were dehydrated in an oven with air circulation and evaluated for drying kinetics using drying curves at 40 °C. After the drying process, four extraction methods: orbital stirrer, ultrasound, thermal agitation and pressurized liquid extraction were applied to recover anthocyanins from dried wine grounds. A composite central design was applied for pressurized liquid extraction, where the independent variables were temperature (°C) and solvent proportion (ethanol: citric acid solution 0.1 mol/L (v/v)) and the response variable was total monomeric anthocyanin content. The extract of wine lees obtained through optimization was characterized for phenolic profile and bioaccessibility of anthocyanins after *in vitro* gastrointestinal simulation. In addition, the *in vitro* antiproliferative activity of the extract was evaluated. As a result of this study, the maximum response for the extraction of anthocyanins from grape pomace was the volume of 10 mL of water: citric acid solution, at a pH of 1.8. The application of cryoconcentration in grape pomace extract has been shown to be an effective method for concentration of bioactive compounds. After three stages of concentration, total solids, total phenolics and total monomeric anthocyanins were approximately 5 times higher than the initial condition of the extract. The increase in the concentration of bioactive compounds reached a process efficiency of 93.11% (stage 1) for phenolic compounds and 90.63% (stage 2) for total anthocyanins. Considering the results obtained, it is concluded that cryoconcentration is a promising option for grape pomace extract, which can be optimized to preserve and concentrate the bioactive compounds of this by-product. Regarding the wine lees, it was observed that the convective dehydration process at 40 °C during 420 minutes of drying removed 88% of water from the sample. Among the different extraction methods, it was observed that the extraction by pressurized liquid in static mode presented the highest content of total monomeric anthocyanins in the extract and its ingredients. citric acid 0.1 mol. L⁻¹ used in a ratio of 50:50 v/v. The anthocyanins delphinidin-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside, petunidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside and malvidin-3-glucoside were identified and properly quantified, with malvidin being the majority in wine lees. During *in vitro* digestion, important changes were observed in anthocyanin concentrations after passing through the gastric and intestinal phases. In *in vitro* digestion analysis of wine lees extract showed that all anthocyanins are bioaccessible in the oral and gastric phase of sham gastrointestinal digestion, however in the intestinal phase only delphinidin-3-glycoside and malvidin-3-glucoside are bioaccessible. In addition, the extract did not show cytotoxicity for cell viability of murine fibroblasts (L929) at the concentration of 500 µg/mL of wine lees extract and showed cytoprotection (500 µg/mL) when subjected to oxidative stress with H₂O₂. The results show the potential of winemaking by-products both from a technological point of view as a natural colorant and when from a health point of view as an ingredient of nutraceutical products.

Keywords: Grape pomace; Wine lees; Green solvent; Extraction by pressurized liquid; Natural dye; Antiproliferative activity.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1.1 - Principais países produtores de vinho no mundo.	22
Figura 1.2 - Fluxograma das etapas básicas para produção de vinhos.	24
Figura 1.3 - Identificação dos subprodutos do processo de vinificação da uva.	28
Figura 1.4 - Conformações estruturais de antocianinas em função das alterações de pH no trato gastrointestinal.	45

Capítulo 2

Figura 2.1 – Amostra de bagaço de uva Montepulciano (<i>Vitis vinífera</i> L.) coletado durante o processo de vinificação.	52
Figura 2.2 - Esquema visual da Crioconcentração em bloco realizada com o extrato inicial do bagaço de uva em três estágios.	54
Figura 2.3 - Gráfico de superfície de resposta para avaliar o efeito do volume de solvente e pH na extração de antocianinas monoméricas totais.	59
Figura 2.4 - Resultados do fator de concentração (CF) de sólidos solúveis totais (°Brix), antocianinas monoméricas totais (mg/L), teor de fenólicos totais (mg/L) e atividade antioxidante (TEAC $\mu\text{mol/L}$) analisada em cada um dos três estágios do processo de crioconcentração (1,2,3).	61

Capítulo 3

Figura 3.1 – Amostras de borra de vinho antes (A) e após (B) o processo de secagem.	84
Figura 3.2 - Curva cinética de secagem da borra a 40 °C.	84
Figura 3.3 - Taxa de secagem da borra à 40 °C. Obtenção das equações da reta e do coeficiente de determinação (R^2).	86
Figura 3.4 - Replicatas das curvas cinéticas de secagem ajustadas ao modelo matemático de Page.	88
Figura 3.5 - Replicatas dos resíduos do modelo de Page.	89
Figura 3.6 - Extração de antocianinas monoméricas totais utilizando diferentes métodos de extração: agitador orbital, ultrassom, extração por líquido pressurizado (ELP) modo estático e agitador térmico.	92
Figura 3.7 - Gráfico de superfície de resposta para avaliar o efeito da temperatura e concentração de solvente na extração total de antocianinas da borra de vinho.	96
Figura 3.8 - Perfil de antocianinas da borra de vinho.	98

Figura 3.9 - Ensaio de citotoxicidade, proteção e atividade antitumoral de extratos de borra de vinho.	105
---	-----

LISTA DE QUADROS

Capítulo 1

Quadro 1.1 - Produtos vitivinícolas e classificação.	27
---	----

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1.1 - Principais estratégias para valorização o bagaço de uva e da borra de vinho.	32
--	----

Capítulo 2

Tabela 2.1 - Variáveis independentes e seus níveis utilizados para o planejamento experimental.	53
Tabela 2.2 - Análise de variância da extração de antocianinas monoméricas totais de bagaço de uva.	58
Tabela 2.3 - Efeitos das variáveis independentes volume e pH de solvente sobre o teor de antocianinas monoméricas totais do extrato do bagaço de uva.....	58
Tabela 2.4 - Resultados do teor de sólidos solúveis totais, antocianinas totais, fenólicos totais, atividade antioxidante, eficiência do processo (EP) e impureza do gelo dos extratos iniciais, frações concentradas (C) e gelo (G) para cada um dos três estágios da crioconcentração.....	63
Tabela 2.5 - Resultados de pH, intensidade de cor e tonalidade dos extratos iniciais, concentrado (C) e frações de gelo (G) para cada um dos três estágios do processo de concentração por congelamento em bloco (1, 2, 3).	65

Capítulo 3

Tabela 3.1 – Variáveis independentes e seus níveis utilizados para o desenho experimental.	76
Tabela 3.2 - Composição química da borra de vinho tinto in natura.	82
Tabela 3.3 - Composição química e propriedades tecnológicas da borra de vinho tinto obtidas por secagem em estufa.....	91
Tabela 3.4 - Teor de antocianinas monoméricas totais, nos onze ensaios de extração por líquido pressurizado (ELP).....	94
Tabela 3.5 - Análise de variância da extração de antocianinas totais de borra de vinho.	95
Tabela 3.6 - Efeitos das variáveis independentes proporção de solvente e temperatura sobre o teor de antocianinas monoméricas totais do extrato da borra do vinho.....	95
Tabela 3.7 – Perfil de polifenóis do extrato da borra de vinho.	100
Tabela 3.8 - Composição de antocianinas individuais (mg/g) do extrato da borra de vinho após simulação gastrointestinal.	103

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
CAPÍTULO 1	20
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
1.1 A INDÚSTRIA VÍTIVINICOLA E A SUSTENTABILIDADE	21
1.2 O PROCESSO DE PRODUÇÃO DO VINHO	23
1.3 SUBPRODUTOS VITIVINÍCOLAS	26
1.3.1 Valorização dos subprodutos vinícolas	30
1.4 TECNOLOGIAS PARA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS	36
1.4.1 Extração convencional por solvente	37
1.4.2 Extração com líquido pressurizado (ELP)	38
1.4.3 Crioconcentração	41
1.5 BIOACESSIBILIDADE DE COMPOSTOS BIOATIVOS E DIGESTÃO <i>IN VITRO</i>	42
CAPÍTULO 2	48
1 INTRODUÇÃO	50
2 MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1 REAGENTES E PADRÕES	51
2.2 AMOSTRAS	52
2.2.1 Preparação do extrato	53
2.3 PROCESSO DE CRIOCONCENTRAÇÃO EM BLOCO GRAVITACIONAL	53
2.3.1 Parâmetros de crioconcentração	54
2.4 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA	56
2.5 DETERMINAÇÃO DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTAIS	56
2.6 DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS	56
2.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	56
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
3.1 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS DO BAGAÇO DE UVA	57
3.2 DESEMPENHO DO PROCESSO DE CRIOCONCENTRAÇÃO DO EXTRATO DO BAGAÇO DE UVA	60

3.3 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EXTRATO CONCENTRADO DE BAGAÇO DE UVA RICO EM ANTOCIANINAS E FRACÇÕES DE GELO	65
4 CONCLUSÃO	66
CAPÍTULO 3.....	68
1 INTRODUÇÃO	70
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	71
2.1 REAGENTES E PADRÕES	71
2.2 AMOSTRAS	72
2.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA BORRA <i>IN NATURA</i>	72
2.4 SECAGEM DA BORRA	73
2.4.1 Modelo matemático.....	73
2.5 PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DA BORRA EM PÓ.....	74
2.6 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO CONVENCIONAL E NÃO CONVENCIONAL DE ANTOCIANINAS DA BORRA EM PÓ	74
2.6.1 Delineamento experimental para extração de antocianinas da borra de vinho em pó por líquido pressurizado.....	75
2.6.2 Determinação de antocianinas monoméricas totais do extrato da borra de vinho.....	76
2.6.3 Determinação da atividade antioxidante	77
2.6.4 Simulação gastrointestinal <i>in vitro</i>	77
2.6.4.1 Bioacessibilidade das antocianinas das frações bioacessíveis	77
2.6.5 Perfil bioativo do extrato da borra de vinho.....	78
2.6.5.1 Polifenóis individuais	78
2.6.5.2 Antocianinas individuais	79
2.6.6 Ensaio de atividade biológica do extrato da borra de vinho.....	79
2.6.6.1 Cultura celular	80
2.6.6.2 Ensaio de citotoxicidade	80
2.6.6.3 Estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio em células	80
2.6.6.4 Atividade antitumoral.....	80
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	81
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
3.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BORRA DE VINHO <i>IN NATURA</i>	81
3.2 CURVA CINÉTICA E TAXAS DE SECAGEM DA BORRA DO VINHO	83
3.2.1 Modelagem matemática	86
3.3 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DA BORRA DE VINHO EM PÓ ...	90
3.4 EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS DA BORRA DE VINHO EM PÓ	92

3.5 OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS DE BORRA DE VINHO POR LÍQUIDO PRESSURIZADO	93
3.6 IDENTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS INDIVIDUAIS EM EXTRATO DE BORRA DE VINHO	97
3.7 IDENTIFICAÇÃO DE POLIFENÓIS INDIVIDUAIS EM EXTRATO DE BORRA DE VINHO	99
3.8 EFEITO DA DIGESTÃO <i>IN VITRO</i> SOBRE A COMPOSIÇÃO DE ANTOCIANINAS DO EXTRATO DA BORRA DE VINHO	102
3.9 Efeito das antocianinas do extrato da borra de vinho na viabilidade celular	104
4. CONCLUSÃO	107
CONSIDERAÇÕES FINAIS	108
REFERÊNCIAS	110
ANEXO A – ARTIGO DE PESQUISA.....	133

1 INTRODUÇÃO

Subprodutos e resíduos do processamento de alimentos à base de plantas, que representam um grande problema de descarte para a indústria, são fontes promissoras para a recuperação de fitoquímicos bioativos e metabólitos secundários tecnologicamente importantes para a indústria de alimentos (Burlini; Sacchetti, 2020; Ribeiro *et al.*, 2022). O cultivo da videira e os processos de vinificação geram quantidade significativa de resíduos e subprodutos, incluindo caules, bagaço e sementes, borras de vinho, tartaratos e águas residuais (Nerantzis; Tataridis, 2006). Na maioria das vezes, apenas uma parcela muito pequena desses materiais é reutilizada, por exemplo, na produção de fertilizantes, ração animal, ou para a produção de combustíveis (Ferri *et al.*, 2020).

Aproximadamente, 74 milhões de toneladas de uvas foram utilizadas na produção de vinho em 2021 (OIV, 2023). A elevada produção de vinho gera uma quantidade considerável de desperdício, pois cerca de 20% do peso das uvas processadas se encontra no produto final (Maicas; Mateo, 2020; Silva *et al.*, 2021). Além disso, o vinho é uma das bebidas alcoólicas mais consumidas em todo o mundo, tornando o manejo de seu subproduto uma importante questão de problema ambiental. Os principais subprodutos gerados a partir da vinificação são bagaço de uva e borras de vinho, sendo que uma tonelada de uva processada produz aproximadamente 0,13 tonelada de bagaço e 0,06 tonelada de borras (Kokkinomagoulos; Kandyli, 2020). O bagaço de uva (casca, sementes e polpa) é gerado após as etapas de desengace e prensagem. As borras de vinho são um material semissólido, também designado de lama, gerado principalmente após processo de fermentação (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). É importante ressaltar que os rendimentos apresentados são valores indicativos e podem variar consideravelmente dependendo da variedade de uva, das condições ambientais, do estágio de maturação da uva e da tecnologia de vinificação (Oliveira; Duarte, 2014; Bordiga, 2015).

Nos últimos anos, esses subprodutos têm atraído considerável atenção como fontes potenciais de fitoquímicos bioativos, que podem ser utilizados para diferentes finalidades nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia. A tendência atual é utilizar e converter subprodutos em produtos úteis e reciclar subprodutos como meio de alcançar um desenvolvimento sustentável. Esses processos de recuperação fazem parte de uma nova filosofia de agricultura sustentável (Ribeiro *et al.*, 2022).

De acordo com os princípios da Economia Circular, onde os subprodutos são convertidos em novas matérias-primas (Adami; Schiavon, 2021), objetiva-se propor esta prática como alternativa inovadora para os subprodutos da vinificação, especialmente o bagaço de uva

e as borras de vinho. Assim, processos de extração e concentração economicamente atrativos, seguros e não poluentes para a recuperação desses compostos são relevantes (Bamba *et al.*, 2018). Além disso, essa abordagem contribui para alcançar os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) adotados pelos Estados Membros das Nações Unidas (2015), com destaque para o ODS9: indústria, inovação e infraestrutura e ODS12: consumo e produção sustentáveis.

A literatura demonstra que ainda há aplicação de processos de extração que utilizam elevadas quantidades de solventes orgânicos para recuperação de fitoquímicos em matrizes vegetais, como por exemplo, os subprodutos da vinificação (Renard, 2018; Jara-Palacios *et al.*, 2020). Recentemente, o uso de solventes GRAS (do inglês *Generally Recognized As Safe*), como alguns álcoois (por exemplo, etanol) ou soluções aquosas acidificadas com ácidos fracos, tem se destacado como uma alternativa menos prejudicial ao meio ambiente, à saúde do operador e do consumidor para a extração de bioativos. Neste sentido, atualmente busca-se por processos mais limpos, visando diminuir o consumo de energia, água e solventes, e a emissão de carbono, e garantir a segurança do meio ambiente e do produto final (Chemat *et al.*, 2019). Diante disso, novas tecnologias de extração como a extração por líquido pressurizado têm sido empregadas para processo de recuperação de compostos bioativos, assim como a aplicação de concentração por baixa temperatura, como a crioconcentração, está sendo usada para recuperar compostos bioativos termolábeis provenientes de subprodutos (Prestes *et al.*, 2023; Arend *et al.*, 2022; Hass *et al.*, 2021).

O uso de processos de extração por líquido pressurizado e processos de crioconcentração em subprodutos de vinificação são de grande relevância. Neste sentido, as principais propostas deste trabalho são a seleção e aplicação de tecnologias de extração e concentração para diferentes subprodutos de vinificação, a fim de recuperar compostos bioativos. Este estudo também visa valorizar e divulgar subprodutos de vinificação pouco explorados, como uma fonte alternativa de compostos com potencial de aplicação na indústria de alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os subprodutos da vinificação de vinho tinto, bagaço de uva e borra de vinho, e avaliar o efeito de diferentes tecnologias na recuperação de diferentes compostos químicos com potencial bioativo e tecnológico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a obtenção de extrato rico em antocianinas a partir do bagaço de uva utilizando um solvente GRAS;
- Aplicar o processo de crioconcentração no extrato rico de antocianinas do bagaço de uva;
- Avaliar o comportamento da crioconcentração e caracterizar as frações obtidas no processo;
- Caracterizar as borras de vinho com relação a cinética de secagem, a composição físico-química e as propriedades tecnológicas;
- Avaliar diferentes métodos de recuperação de antocianinas da borra do vinho;
- Otimizar a recuperação de antocianinas da borra do vinho;
- Caracterizar os extratos da borra de vinho quanto a composição fenólica total e individual, antocianinas individuais e atividade antioxidante *in vitro*;
- Avaliar o efeito da digestão *in vitro* do extrato de borra de vinho na bioacessibilidade das antocianinas;
- Avaliar a atividade biológica através do ensaio de citotoxicidade, proteção e atividade antitumoral de extratos de borra de vinho.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

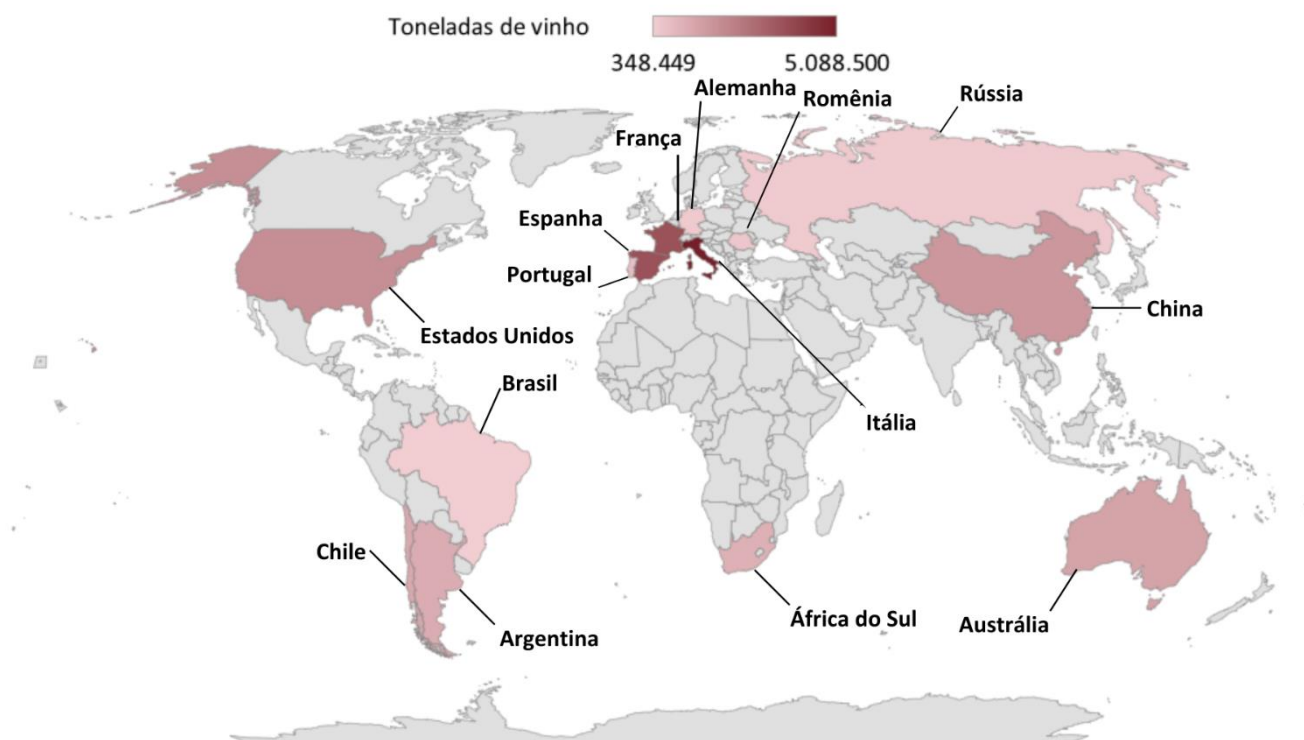
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 A INDÚSTRIA VÍTIVINICOLA E A SUSTENTABILIDADE

A indústria do vinho representa um dos setores econômicos mais importantes em diferentes regiões do mundo. A extensa área territorial destinada ao cultivo da videira faz desta uma das principais atividades agrícolas do mundo. A Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) estima que a produção de vinho no ano de 2023 foi de 237 milhões de hectolitros (OIV, 2024). O valor atrelado a essa atividade assim como a grande quantidade de produção, está associada à utilização de muitos recursos relacionados tanto ao consumo de água como também da utilização de produtos orgânicos e inorgânicos. Com o objetivo de alcançar uma produção vitivinícola sustentável essa prática deve estar associada à correta utilização desses recursos tanto no campo quanto nas cantinas de produção (Mariani e Vastola, 2015).

De acordo com os últimos dados publicados pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*), que correspondem ao ano de 2021, o vinho foi produzido em cerca de 65 países. Este número reflete a ampla distribuição geográfica da produção de vinho, com os principais produtores concentrados na Europa, América do Norte, América do Sul, África, Ásia e Oceania (FAO, 2024). Os principais países produtores de vinho do mundo são apresentados na Figura 1.1.

Figura 1.1 - Principais países produtores de vinho no mundo.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

No Brasil, a vitivinicultura vem apresentando importante crescimento. Nas últimas décadas, a expansão das áreas de cultivo de uvas viníferas e das vinícolas produtoras de vinhos finos aumentou, colocando o país entre os grandes produtores mundiais. De acordo com a OIV, o país é o 15º maior produtor de vinhos e o 14º produtor de uvas do mundo. Em 2023, o Brasil registrou uma produção de vinhos de 3,6 milhões de hectolitros um crescimento de 12% em relação ao ano anterior (OIV, 2024). Além disso, o consumo interno também apresentou um aumento notável de 11,6%, atingindo 4 milhões de hectolitros. Atualmente, a Região Sul do país destaca-se como a maior produtora de uvas do país, com uma produção de aproximadamente 767,3 mil toneladas em 2022. O estado de Santa Catarina possui cerca de 5.000 hectares de vinhedos implantados, com uma produção anual de 115 mil toneladas de uvas. As regiões de altitude, como a Serra Catarinense, são particularmente importantes para a produção de vinhos finos e espumantes, acompanhando a tendência nacional de aumento no consumo desses produtos (EPAGRI, 2024; PAM-IBGE, 2024).

Nos últimos anos a demanda pelo desenvolvimento sustentável tornou-se objetivo prioritário do ponto de vista social, político e econômico e o setor vitivinícola mundial está fortemente empenhado em melhorar a sustentabilidade de sua cadeia de produção e consumo (Wei et al., 2022). Neste contexto, a OIV, organização cuja a maioria dos países produtores de

vinho são membros, desenvolveu as Diretrizes para Vitivinicultura Sustentável e definiu essa prática como uma estratégia global à escala dos sistemas de produção e processamento de uvas (OIV, 2020).

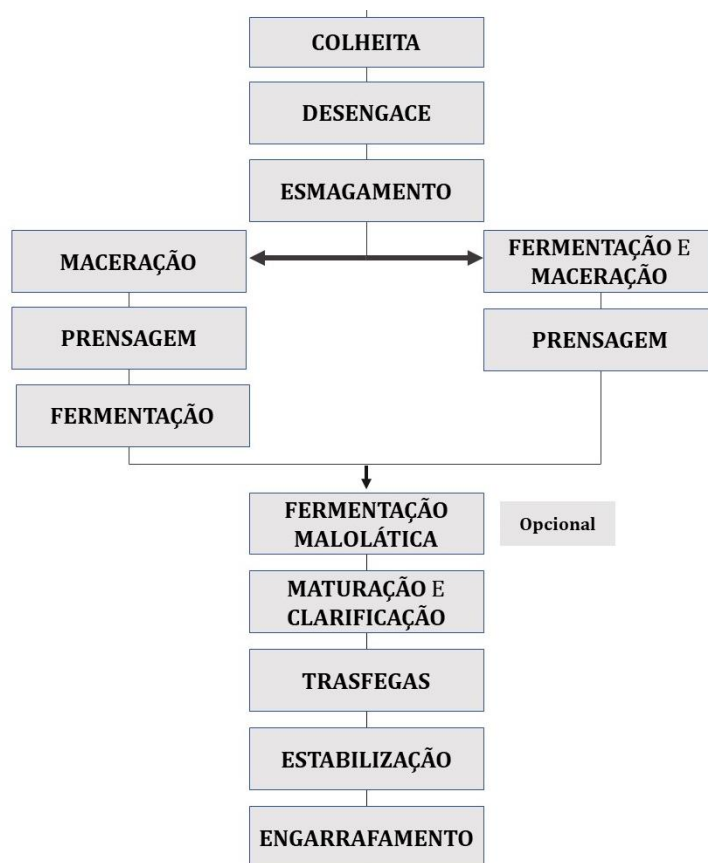
De acordo com estas diretrizes, as avaliações de risco ambiental devem considerar, entre outros, os seguintes aspectos: local (para novas vinhas/adegas), biodiversidade, seleção de variedades, gestão do solo e água, utilização de energia, gestão de recursos humanos e uso de agroquímicos, águas residuais e a gestão de resíduos do processo de produção do vinho. Nesta perspectiva, a gestão sustentável dos resíduos torna-se um importante aliado no que diz respeito à sua redução ou reaproveitamento (OIV, 2020; Maicas e Mateo, 2020).

O setor vitivinícola enfrenta diversas questões relacionadas à geração de resíduos no processo de produção de vinhos (Spigno *et al.*, 2013). Esses resíduos apresentam, como principal característica, altas concentrações de matéria orgânica, o que pode causar grandes impactos ambientais, como contaminação de solo e águas, quando descartados de forma inadequada. (Pinter *et al.*, 2019). Portanto, compreender as etapas do processo de produção do vinho e identificar os resíduos produzidos durante esse processo é fundamental para utilizar e aplicar esses recursos de forma sustentável, promovendo assim a implementação da vitivinicultura sustentável.

1.2 O PROCESSO DE PRODUÇÃO DO VINHO

O processo de produção de vinho é um conjunto de operações realizadas para transformar a uva madura em vinho denominado de vinificação (Figura 1.2). Todo este processo compreende diferentes etapas, que pode ser dividido em etapas pré-fermentativas, cujo início ocorre com a colheita da uva, quando esta atinge a maturação tecnológica e fenólica, fermentativas para obtenção do vinho e etapas pós-fermentativas, finalizada com o engarrafamento do vinho (Ribereau-Gayon; Dovaz, 1997).

Figura 1.2 - Fluxograma das etapas básicas para produção de vinhos.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Na etapa pré-fermentativa para obtenção do mosto, primeiramente ocorre o desengace e o esmagamento (ou prensagem) das uvas, que tem por finalidade separar o engaço, folhas e talos de uva (denominados de MOG do inglês *material other than grapes*), romper a casca das bagas e extrair o líquido e, se desejado, iniciar a maceração. A realização do desengace antes do esmagamento é desejável pois minimiza a absorção de fenólicos e lipídios presentes no engaço, evitando assim características indesejáveis ao vinho. A presença do engaço acarreta na liberação de substâncias adstringentes como o tanino verde, aumentando consideravelmente a adstringência dos vinhos e acentuando os gostos herbáceos. Quando triturado, pode promover a diluição do mosto, além de interferir, principalmente, na composição mineral do mesmo. O engaço não alcança um nível adequado de maturação, e a separação antecipada é fundamental para a qualidade do vinho (Giovannini e Manfroi, 2009). Alguns pesquisadores sugerem que a extração de compostos do engaço pode ser de interesse quando se trata de variedades

tintas com baixo teor de compostos fenólicos, como por exemplo, a variedade Pinot Noir (Sun *et al.*, 1999). Como algumas bagas são inevitavelmente rompidas durante o desengace, levando ao escurecimento oxidativo, o esmagamento pode ocorrer imediatamente após ou de forma simultânea na desengaçadeira. As desengaçadeiras geralmente possuem um cilindro externo perfurado que permite a saída da baga, mas restringe a passagem de talos, engaço e folhas (Jackson, 2020).

O esmagamento pode ser realizado por vários processos, os mais comuns incluem pressionar a baga contra uma parede perfurada ou passá-la por um conjunto de rolos. No primeiro, as bagas são perfuradas e o suco, polpa, sementes e cascas são coletados e bombeados para um tanque ou cuba de retenção. Neste último processo, as bagas são esmagadas entre um par de rolos girando em direção oposta (Jackson, 2020).

A maceração refere-se a um período durante o qual os constituintes se difundem dos sólidos da uva (bagaço) para o mosto visando a extração dos compostos presentes nas cascas e nas sementes. A etapa de maceração facilita a extração de nutrientes, aromas e outros constituintes da polpa, cascas, sementes e ocasionalmente engaço. Para os vinhos brancos, a maceração é mínima e raramente permanece mais do que algumas horas. Em geral, a maceração mínima em temperaturas frias é frequentemente preferida para a produção de vinhos jovens, frescos e frutados. Para os vinhos tintos, a maceração é prolongada e ocorre simultaneamente com o início da fermentação alcoólica. O álcool gerado pelo metabolismo das leveduras favorece a extração de antocianinas (Canals *et al.*, 2005).

Para o processo de vinificação dos vinhos brancos, as cascas são retiradas, geralmente, antes da fermentação, além disso, antes dessa etapa, o mosto passa por um processo de clarificação para remover partículas sólidas em suspensão. É importante mencionar que na elaboração do vinho rosé, o tempo de maceração nesta etapa pré-fermentativa é responsável pela coloração do vinho incorpora a cor proveniente das cascas das uvas tintas, mas não o suficiente para ser considerado um vinho tinto (Caldas *et al.*, 2018; Jackson, 2020).

Uma vez finalizada as etapas pré-fermentativas o mosto é submetido ao processo de fermentação alcoólica, comumente são utilizadas cepas específicas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os açúcares do mosto das uvas são transformados em álcool etílico, gás carbônico e em congêneres aromáticos (glicerol, álcoois superiores, aldeídos, ésteres e ácidos orgânicos) (Jackson, 2020).

Após completar a fermentação alcoólica, o vinho pode ser submetido a fermentação malolática, caracterizada pela transformação do ácido málico em ácido láctico, por bactérias lácticas (*Leuconostoc oenos*). Esse processo é realizado principalmente em vinho tinto e tem

como objetivo reduzir a acidez, fornecer estabilidade biológica ao vinho e interação entre compostos químicos que acentuam o aroma do vinho (Jackson, 2020).

Após a etapa de fermentação os vinhos passam por um período de ajuste (maturação) antes do engarrafamento. As etapas pós-fermentativas envolvem a remoção ou precipitação de material particulado e coloidal através das etapas de estabilização e clarificação. A estabilização e clarificação envolvem procedimentos destinados a produzir um vinho brilhantemente límpido, sem falhas de sabor. Depois de várias semanas a meses, o vinho é trasfegado (Jackson, 2008).

A trasfega separa o vinho dos sólidos que se depositam durante a pós-fermentação. Após a fermentação, os constituintes celulares são liberados lentamente no vinho. Isso está associado à autólise de células de levedura morta, portanto, esse sedimento consiste principalmente de leveduras e células bacterianas, restos de células de uva e também de taninos precipitados, proteínas e cristais de tartarato de potássio. Como isso pode ativar atividade microbiana indesejável, a primeira trasfega normalmente ocorre logo após a fermentação. Quando a fermentação malolática é desejada, no entanto, a trasfega é retardada até que a conversão do ácido málico em ácido láctico esteja completa. A trasfega também é atrasada se for desejado o contato superficial com o sedimento (Jackson, 2020).

O vinho pode ser engarrafado ou envelhecido em barril de carvalho com posterior engarrafamento. A etapa de envelhecimento dos vinhos visa melhorar o sabor e o aroma da bebida. Para esse processo, a principal madeira utilizada para a confecção de tonéis de envelhecimento é o carvalho, em decorrência de suas propriedades de dureza e impermeabilidade à água (Ribereau-Gayon; Dovaz, 1997; Jackson, 2020).

1.3 SUBPRODUTOS VITIVINÍCOLAS

A valorização dos produtos secundários produzidos em diversos pontos e etapas da cadeia produtiva da indústria da uva e do vinho é um tema que vem ganhando cada vez mais atenção. Esses produtos precisam ser definidos com relação à sua natureza e uso. No entanto, é difícil identificá-los em termos de leis ou estruturas gerais, diante disso a descrição qualitativa de cada produto vitivinícolas é apresentada no Quadro 1.1.

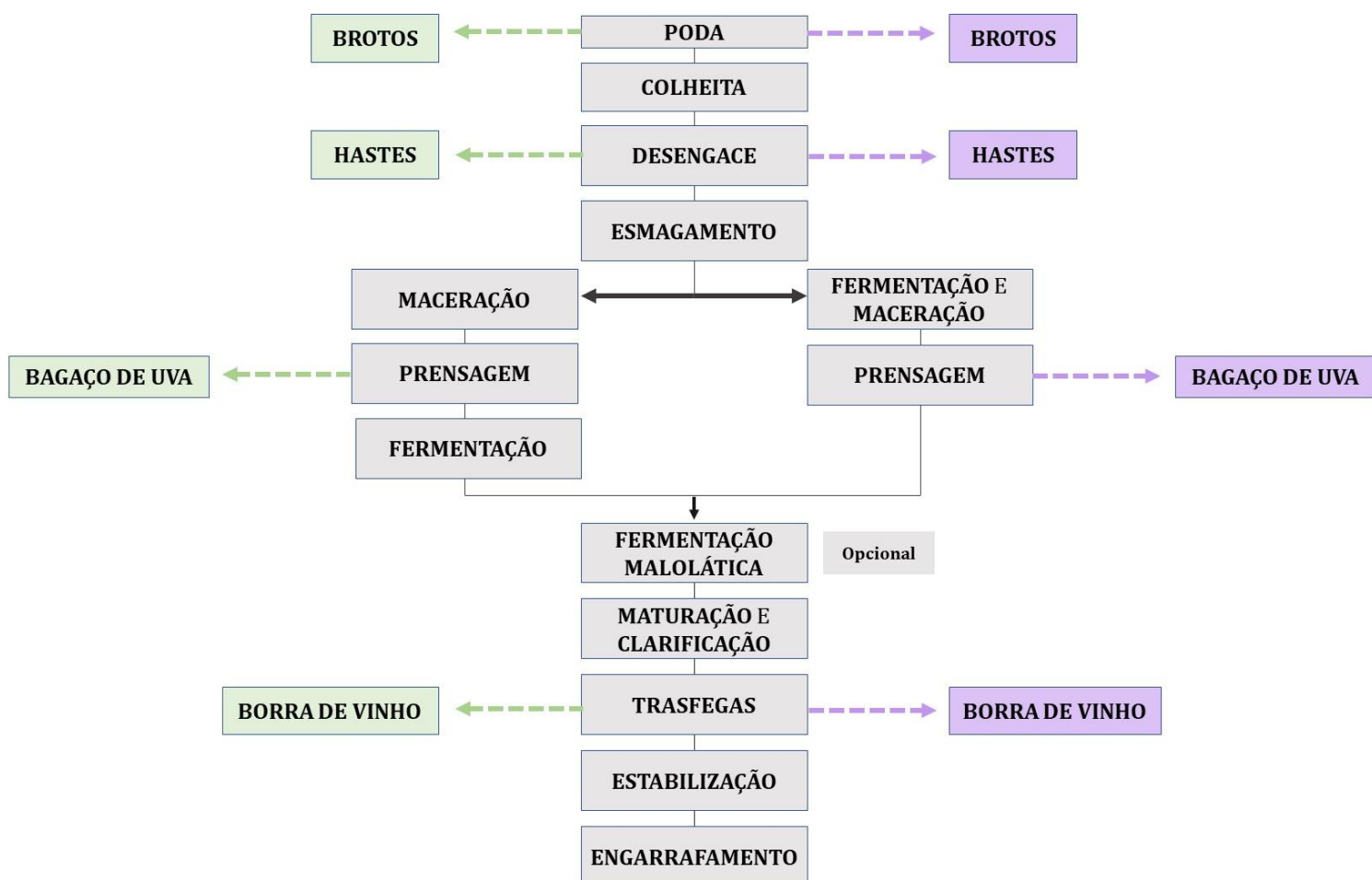
Quadro 1.1 - Produtos vitivinícolas e classificação.

Rejeito	Resíduo	Subproduto	Coproducto
Produzido como resultado de um processo vitivinícola e com um impacto ambiental negativo.	Produzido como resultado de um processo vitivinícola e sem impacto ambiental negativo.	Produzido como resultado de um processo vitivinícola e com ou sem impacto ambiental negativo.	Produzido como resultado de um processo vitivinícola, mas como produto secundário.
Não é adequado para reciclagem ou processamento para obter algum valor agregado.	Não é adequado para reciclagem ou processamento para obter algum valor agregado.	Adequado para reciclagem ou processamento para obter algum valor adicionado.	Com valor econômico e industrial bem definido (valor agregado).

Fonte: Secretariat Viti OIV (2018).

Um dos principais subprodutos agroindustriais produzidos mundialmente é originário do processamento da uva (Zacharof, 2017), principalmente da indústria vinícola, com 75 milhões de toneladas de uvas produzidas por ano, cerca de 75% dessa produção são utilizadas para a produção de diferentes tipos de vinho (Amaya-Chantaca *et al.*, 2022). De acordo com Beres *et al.* (2017), 1 kg de uva é necessário para produzir 0,75 L de vinho tinto. Os principais subprodutos gerados no processo de vinificação incluem o bagaço, que compreende os engaços, sementes e cascas obtidos após a etapa de desengace e prensagem da uva e as borras originadas nas etapas pós-fermentativas, além de água residuais ricas em compostos orgânicos. A Figura 1.3 mostra o fluxograma do processo de vinificação com a identificação dos principais subprodutos.

Figura 1.3 - Identificação dos subprodutos do processo de vinificação da uva.



Legenda: Fluxograma da direita representa as etapas e subprodutos (em roxo) do processo de vinho tinto e o fluxograma da esquerda representa as etapas e subprodutos (em verde) do processo de vinho branco.

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A composição química dos subprodutos derivados da viticultura e vinificação depende principalmente do tipo de resíduo, da cultivar da uva e do processamento do vinho. No entanto, os principais compostos que podem fazer parte da composição destes subprodutos incluem lipídios, proteínas, celulose, hemiceluloses, lignina e compostos fenólicos (De Iseppi *et al.*, 2020). Diversos compostos fenólicos foram identificados no bagaço de uva e na borra do vinho, como por exemplo, antocianinas, flavonóis, estilbenos, flavan-3-ols, ácidos hidroxicinâmico, ácidos hidroxibenzóico e resveratrol (Sirohi *et al.*, 2020).

As antocianinas são pigmentos de coloração vermelha e são altamente suscetíveis a transformações químicas devido à ação de agentes como luz, oxigênio, temperatura, pH, solventes e íons metálicos (Beres *et al.*, 2017). Devido a isso, um dos grandes desafios da

indústria de alimentos é a estabilização da antocianina para ser utilizado como corante natural (Rodriguez-Amaya, 2019; Mejica *et al.*, 2022).

Os ácidos fenólicos possuem um grupo funcional de ácido carboxílico e são classificados em dois grupos, os ácidos hidroxicinâmico, neste grupo estão presentes o ácido gálico, ácido cafeico, ácido *p*-cumarico, ácido clorogênico, ácido ferúlico e ácido sinápico, e compostos aromáticos com uma cadeia lateral de três carbonos. E no outro grupo estão os ácidos hidroxibenzóicos, que incluem os ácidos protocatecúico, vanílico e os ácidos *p*-hidroxibenzóico (Beres *et al.*, 2017).

Os flavanóis como a catequinas e os flavanoides como as proantocianidinas são extremamente importantes nas características sensoriais do vinho, contudo grande parte desses compostos permanecem nos subprodutos após o processo de vinificação (Mir-Cerdà *et al.*, 2023). Na casca da uva podem ser encontrados flavonoides como as catequinas, galocatequinas e proantocianidinas e nas sementes são encontradas maiores quantidades de catequinas e procianidinas. Nas borras de vinho, a astilbina (glicosídeo flavanona) e a catequina (flavanol) foram encontradas em maior concentração (Mir-Cerdà *et al.*, 2023). Os principais flavonóis encontrados no bagaço de uva são a quercetina, isoramnetina, miricetina e kaempferol (Beres *et al.*, 2017). O resveratrol é um estilbeno sendo encontrado no bagaço da uva na forma glicosiladas e isoméricas e na forma de *cis* e dímeros *trans* resveratrol (Flamini *et al.*, 2013).

Os antioxidantes presentes nos subprodutos de vinificação têm a capacidade de eliminar os radicais livres, tendo assim fundamental importância no tratamento de doenças degenerativas como aterosclerose, câncer, atua também nos processos inflamatório, possuem atividades antimicrobianas e estão envolvidos na proteção contra a oxidação lipídica (Trošt *et al.*, 2016). É importante ressaltar que os compostos fenólicos dos subprodutos vinícolas demonstraram interessantes atividades de promoção da saúde *in vitro* (Hass *et al.*, 2020) e *in vivo* (Hamza *et al.*, 2018).

O principal subproduto do processo de vinificação é o bagaço de uva, obtido na etapa de prensagem do vinho tinto, é constituído principalmente de cascas e sementes e em menor proporção o engaço. O bagaço tem uma composição geral de aproximadamente 40% de fibra, 10% a 20% de lipídios, 5% a 10% de proteína, 2% a 8% de açúcares solúveis, 5,7% de cinzas, 6,5% de umidade e vários compostos fenólicos como catequinas, flavonóis, ácidos fenólicos e antocianinas (Tseng; Zhao, 2012, Yu; Ahmedna, 2013, Sousa *et al.*, 2014).

A composição da casca é baseada principalmente em celulose, xiloglucano, arabina, galactano, xilano e ácido man-pectina, proantocianidinas insolúveis, lignina e proteínas estruturais (Deng *et al.*, 2011). As sementes presentes nos sub-produtos da uva representam 2%

a 5% do peso total da uva (Beres *et al.*, 2017). A composição da semente é de 11,53% de proteína, 47,56% de fibra alimentar total, 4,31% de baixo teor de gordura e 5% a 8% de polifenóis dependendo da variedade (Rombaut *et al.*, 2015). Os compostos fenólicos presentes nas sementes de uva são principalmente flavonoides, incluindo flavonoides monoméricos (catequina, epicatequina, galocatequina, epigallocatequina e epicatequina galato), dímeros de procianidina e procianidinas (Cheng *et al.*, 2012).

Outro subproduto do processo de vinificação é a borra de vinho, composta por etanol, ácido tartárico e células de levedura (Dimou *et al.*, 2015). No processo de vinificação, quando as uvas são esmagadas ou prensadas, a fermentação pode causar alterações na composição dos carboidratos, mas não na composição química dos compostos bioativos. Portanto, quantidades significativas desses compostos são retidas pelo bagaço e consequente pela borra. Pesquisadores demonstraram que até 70% dos compostos fenólicos podem ser preservados após as uvas serem prensadas e processadas (Beres *et al.*, 2017). Os compostos fenólicos podem ser potencialmente recuperáveis a partir de borras de vinho, agregando valor à indústria do vinho. Bustamante *et al.* (2008) relataram que as borras de vinho contêm entre 1,9 e 16,3 g de polifenóis/kg, dependendo do tipo de vinho e do processamento. Pesquisas recentes têm se concentrado na caracterização desse subproduto, identificando vários compostos fenólicos como ácidos fenólicos, flavonóis, flavanóis e antocianinas (Romero-Díez *et al.*, 2018, Matos *et al.*, 2019, Romero-Díez *et al.*, 2019, Jara-Palacios *et al.*, 2019).

Nos últimos anos, aumentou o interesse no desenvolvimento de pesquisas usando subprodutos agrícolas ou resíduos agroindustriais (Zhao *et al.*, 2018; Sánchez-Ponce *et al.*, 2021). Esses materiais são abundantes, facilmente disponíveis e de baixo custo, o que justifica e possibilita diversas pesquisas. Além disso, a indústria vitivinícola está buscando alternativas para gerenciar sua grande quantidade de subproduto como matéria-prima, por isso muitos trabalhos têm sido desenvolvidos para valorização desse subproduto (Sánchez-Ponce *et al.*, 2021).

1.3.1 Valorização dos subprodutos vinícolas

Atualmente, a valorização dos subprodutos provenientes do processo de vinificação é representada principalmente pelo seu uso como fertilizantes do solo e compostagem, produção de biomassa e alimentação animal. No entanto alguns compostos presentes nos subprodutos das vinícolas são fitotóxicos e apresentam efeitos antimicrobianos durante a compostagem, o que afeta seu uso para esse fim (Mirabella *et al.*, 2014). Além disso, o uso para compostagem

não pode fornecer uma solução completa devido à enorme quantidade de terra necessária para essa disposição e grandes quantidades de bagaço são produzidas durante um curto período de colheita, o que aumenta a concentração por área (Beres *et al.*, 2017). O descarte de subprodutos vinícolas no meio ambiente sem nenhum tratamento prévio pode resultar em impactos ecológicos como contaminação, geração de odores, disseminação de doenças e contaminação dos lençóis freáticos por taninos, danos à vegetação, poluição do solo, entre outros (Mirabella *et al.*, 2014).

Em relação ao seu uso na alimentação animal, certos componentes, como os taninos condensados, afetam negativamente a digestibilidade dos animais. Além disso, essa alternativa não aproveita todo o potencial dos subprodutos, pois podem ser utilizados para a obtenção de novos produtos de alto valor agregado. Uma alternativa interessante para este resíduo é a utilização como substrato de fermentação ou hidrólise para a produção de ácidos orgânicos (Kopsahelis *et al.*, 2017), compostos fenólicos (Pedrali; Barbárie; Lavelli, 2020), enzimas (Meini *et al.*, 2021), entre outros produtos importantes. O aproveitamento desses subprodutos como fonte de compostos bioativos para aplicação nas indústrias farmacêutica, cosmética e de alimentos também é uma alternativa valiosa, a tabela 1.1 apresenta as pesquisas com as principais estratégias de valorização do bagaço de uva e da borra de vinho.

Tabela 1.1 - Principais estratégias para valorização o bagaço de uva e da borra de vinho.

Autores	Fonte	Principais objetivos	Principais conclusões
Martins; Macedo; Macedo, 2020	Bagaço de uva biotransformado	Avaliar o efeito de extratos de bagaço de uva biotransformados com tanase na atividade anti-inflamatória intestinal	Efeito anti-inflamatório em células Caco-2, indicando que a aplicação de um bioprocessamento em bagaço de uva pode contribuir para o desenvolvimento de novos ingredientes com potencial anti-inflamatório
Pulgar <i>et al.</i> , 2021	Bagaço de uva microencapsulado	Avaliar o efeito de uma suplementação dietética de polifenóis de extrato de bagaço de uva microencapsulado	Dietas suplementadas com bagaço de uva microencapsulado melhoram a capacidade antioxidante dos peixes
Gasinski <i>et al.</i> , 2022	Bagaço de uva branca	Investigar se os resíduos da indústria do vinho poderiam ser usados para modificar o teor volátil e fenólico das cervejas	A adição de bagaço de uva branca aumentou a concentração de compostos fenólicos nas cervejas testadas
Dong <i>et al.</i> , 2021	Bagaço de uva tinta	Extrair e fracionar polissacarídeos do bagaço de uva tinta e caracterizar as suas propriedades	A extração de polissacarídeos também pode ser incluída na utilização integrada do bagaço de uva tinta para reduzir a poluição ambiental da indústria vinícola
Meini <i>et al.</i> , 2021	Bagaço de uva	Avaliar a fermentação em estado sólido de proteases fúngicas em bagaço de uva com a adição de ácido tânico para induzir a enzima tanase para produzir polifenóis funcionais	Os extratos funcionais foram obtidos do bagaço de uva por fermentação em estado sólido e fermentação fúngica. A atividade prebiótica dos extratos de bagaço de uva foi aumentada por enzimas hidrolíticas produzidas por fungos. Eles são propostos como um novo aditivo alimentar
Pedrali; Barbárie; Lavelli, 2020	Bagaço de uva (sementes)	Investigar matrizes alimentares modelo para a obter sementes de uva ricas em proantocianidina e encapsular os fenólicos em hidrogel	Os fenólicos extraídos das sementes de uva podem ser encapsulados em hidrogéis de alginato-Ca ⁺⁺ ou alginato-Ca ⁺⁺ -quitosana

Autores	Fonte	Principais objetivos	Principais conclusões
Bucić-Kojić <i>et al.</i> , 2020	Bagaço de uva	Aumentar a produção de compostos fenólicos e melhorar o potencial anti-inflamatório do bagaço de uva após tratamento em estado sólido com fungo da podridão branca (<i>T. versicolor</i>)	A aplicação da fermentação em estado sólido de base fúngica aumentou a composição fenólica e potencial anti-inflamatório do bagaço de uva
Fernández-Fernández <i>et al.</i> , 2019	Bagaço de uva	Caracterização das propriedades biológicas de extratos, para a avaliação do seu potencial como ingrediente funcional	Extratos com potenciais propriedades antioxidantes, antidiabéticas, antiobesidade e anti-inflamatórias, sugerindo seu uso como um novo ingrediente funcional para a prevenção e/ou tratamento de doenças crônicas
Canalejo <i>et al.</i> , 2021	Bagaço de uva	Otimizar um método para recuperar polissacarídeos de bagaço de uva branca (não fermentado)	As condições ótimas selecionadas permitiram a extração de polissacarídeos de bagaço de uva rico em arabinose e galactose, ramnogalacturonanos, homogalacturonanos e polissacarídeos de glicosil
Romero-Díez <i>et al.</i> , 2019	Borras de vinho do Porto	Extração das antocianinas das borras de vinho	As borras de vinho apresentam concentrações de antocianinas mais elevadas do que o bagaço de uva. O pré-tratamento por micro-ondas melhora a extração de antocianinas em até duas vezes
Dimou <i>et al.</i> , 2015	Borras de vinho tinto de uva Merlot	Desenvolver uma biorrefinaria integrada à base de borras de vinho que leve à produção de um suplemento rico em nutrientes com produção simultânea de etanol, antioxidantes e tartarato	As borras de vinho podem ser usadas para a produção de suplementos de fermentação ricos em nutrientes para a produção altamente eficiente de poli(3-hidroxibutirato) após a extração de componentes de valor agregado

Autores	Fonte	Principais objetivos	Principais conclusões
Kontogiannopoulos; Patsios; Karabelas, 2016	Borras de vinho tinto de uvas Merlot e Syrah	Desenvolvimento de um processo econômico e ecológico para a dissolução do ácido tartárico	A recuperação do ácido tartárico das borras de vinho pode ser obtida usando resina de troca catiônica
Romero-Díez <i>et al.</i> , 2018	Borras de vinho tinto de uvas Tempranillo	Caracterização fenólica de borras de vinho envelhecidas	Foi demonstrada uma correlação entre diferentes atividades antioxidantes, fenóis totais e compostos identificados. As antocianinas são os compostos que mais contribuem para a atividade antioxidante
López-Fernández-Sobrino <i>et al.</i> , 2021	Borras de vinho tinto de uvas Cabernet, Garnacha, Mazuela e Merlot e borras de vinho branco de uvas Macabeo	Investigar a atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina e o efeito de redução da pressão arterial	As borras de vinho Cabernet exibiram uma potente atividade anti-hipertensiva. Esse efeito foi relacionado ao alto teor de antocianinas e flavonoides presentes nessas borras
Bravo <i>et al.</i> , 2021	Borras de vinho tinto de uvas Cabernet da 1ª trasfega	Investigar a presença de peptídeos anti-hipertensivos no hidrolisado de borras de vinho	Os peptídeos podem contribuir para o efeito anti-hipertensivo do hidrolisado de borras de vinho. Novos peptídeos anti-hipertensivos são gerados pela hidrólise das borras de vinho
De Iseppi <i>et al.</i> , 2021	Borras de vinho tinto de uvas Merlot e borras de vinho branco de uvas Glera	Avaliação da atividade emulsionante e das propriedades espumantes de extratos obtidos a partir de borras de vinho	As borras de vinho podem representar uma fonte eficiente de proteínas de levedura em comparação com as biomassas de leveduras atualmente utilizadas pela indústria biotecnológica

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

O bagaço de uva é o subproduto do processo de vinificação mais explorado cientificamente, existem diversos trabalhos sobre a extração de compostos fenólicos em sementes e/ou casca de uvas (Bucić-Kojić *et al.*, 2020; Pedrali; Barbárie; Lavelli, 2020; Martins; Macedo; Macedo, 2020; Meini *et al.*, 2021), apenas alguns estudos são focados na extração dos constituintes de outros subprodutos que são gerados no mesmo processo (Romero-Díez *et al.*, 2019; De Iseppi *et al.*, 2021).

Os potenciais usos de subprodutos da vinificação pouco explorados, como as borras de vinho, precisam de mais pesquisas nesse âmbito. As borras de vinho têm sido utilizadas para o desenvolvimento de biorrefinarias integradas, levando à produção de vários produtos de valor agregado, incluindo antioxidantes, sais tártaros, etanol e suplementos nutricionais para o processo de fermentação, como a produção de poli(3-hidroxibutirato) (Dimou *et al.*, 2015). Para além dos usos industriais, estudos recentes têm investigado o potencial das borras de vinho para a saúde, avaliando seu impacto em doenças crônicas não transmissíveis.

López-Fernández-Sobrinho *et al.* (2021) avaliaram o efeito anti-hipertensivo da fração solúvel de borras de vinho de uvas Cabernet. A presença de flavanóis e antocianinas nas borras de vinho foi capaz de reduzir a pressão arterial em ratos hipertensos, comprovando que os componentes fenólicos das borras de vinho possuem propriedades benéficas à saúde e devem ser valorizados em pesquisas na área. Além disso, borras de vinho hidrolisadas por enzima proteolítica são consideradas uma fonte de peptídeos anti-hipertensivos e extratos ricos de manoproteínas-oligossacarídeos, com grande potencial como ingredientes funcionais (Bravo *et al.*, 2022).

O bagaço de uva e a borra de vinho são matérias-primas de grande relevância e valor, demandando uma abordagem estratégica, pois podem contribuir para o desenvolvimento de novos produtos. A recuperação de compostos bioativos e a análise de sua composição química possibilitam a criação de ingredientes inovadores, de grande interesse para as indústrias de alimentos e suplementos (Bordiga, 2015).

A extração de compostos fenólicos representa um dos principais passos para a valorização dos subprodutos da vinificação. Portanto, métodos acessíveis, ambientalmente adequados e econômicos são necessários para serem explorados. O estudo desses métodos é o foco de novas tecnologias e química verde, que evitam o uso de solventes orgânicos caros e prejudiciais ao meio ambiente ou soluções ácidas comumente usadas nos procedimentos convencionais de extração (Chowdhary *et al.*, 2021; Rivera *et al.*, 2021).

Diversas técnicas de extração são usadas para avaliar fatores como tempo, temperatura e tamanho de partícula. Fluidos supercríticos (Pazir *et al.*, 2021), bem como o uso de métodos

de micro-ondas (Perra *et al.*, 2022) ou ultrassom (da Rocha; Noreña, 2020) para obtenção de compostos fenólicos estão entre as técnicas emergentes utilizadas recentemente. A recuperação de compostos fenólicos dos subprodutos vitivinícolas tem sido realizada usando CO₂ supercrítico (Wu *et al.*, 2009) e também tecnologia de membrana (Giacobbo *et al.*, 2017; Giacobbo *et al.*, 2015).

Essas técnicas são potencialmente adequadas para aplicações em larga escala para obter extratos fenólicos de grau alimentício, que podem ser utilizados e aplicados pela indústria de alimentos como aditivos naturais antioxidantes e antimicrobianos (Jara-Palacios, 2019).

1.4 TECNOLOGIAS PARA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

As tecnologias de concentração e extração desempenham um papel crucial na obtenção eficiente de compostos bioativos, destacando sua importância fundamental no processo de valorização subprodutos. A concentração de alimentos líquidos é uma prática essencial adotada extensivamente pela indústria alimentícia. Seu propósito é a extração da água dos produtos alimentícios, resultando em um aumento na concentração de sólidos totais. Essa técnica proporciona maior estabilidade bioquímica e microbiológica, contribuindo para a prolongação da vida útil dos produtos nas prateleiras (Zielinski *et al.*, 2018; Orellana-Palma *et al.*, 2017). A concentração pode ser alcançada por meio do mecanismo de crioconcentração ou simplesmente denominada de concentração por congelamento. A técnica de crioconcentração é uma tecnologia emergente em que a solução alimentar aquosa é concentrada por meio do congelamento parcial ou total da água (Petzold, Niranjana, Aguilera, 2013). É um método utilizado para concentrar um soluto em uma solução com base na separação de seus cristais de gelo puros de uma solução concentrada por congelamento e permite a obtenção de produtos de alto valor nutritivo, biológico e sensorial, com grande potencial de aplicação pela indústria de alimentos (Orellana-Palma *et al.*, 2017).

A extração é uma etapa importante na identificação, isolamento e recuperação dos componentes de subprodutos e inúmeras tecnologias têm sido avaliadas para recuperação de compostos alvo. A etapa de extração pode ser influenciada por diversos fatores, como o tipo de solvente, temperatura, tempo, forma de agitação, razão sólido/líquido, pH, pressão, estrutura molecular da amostra e tamanho das partículas. As características intrínsecas das amostras asseguram que cada sistema se comporte de uma forma específica durante o processo de extração (Zhang *et al.*, 2018).

Para as matrizes vegetais, os métodos de extração são divididos em duas categorias: convencional e não convencional (Galanakis *et al.*, 2013). Os métodos convencionais são também classificados como tradicionais uma vez que estão sendo usados por um longo período de tempo e incluem extração Soxhlet, sonicação, maceração, extração de refluxo, mistura e extração sólido-líquido. Essas técnicas geralmente demandam de longos tempos de extração e grandes quantidade de amostras, sorvente e solventes orgânicos, sendo que estes últimos possuem alto custo de compra e descarte, além de seu impacto negativo no meio ambiente e na saúde humana (Cseri *et al.*, 2018). A principal desvantagem dos métodos de extração convencionais é que os extratos finais geralmente requerem concentração e limpeza subsequentes antes da análise. Além disso, as técnicas convencionais de extração não são a melhor escolha para recuperar compostos bioativos sensíveis e termolábeis encontrados em baixas concentrações nas amostras (Galanakis *et al.*, 2013; Barba *et al.*, 2016). Em decorrência desses fatores, houve a necessidade de desenvolver novos métodos de extração não convencionais.

Os métodos não convencionais incluem técnicas como extração supercrítica (Casas *et al.*, 2010), extração assistida por ultrassom (González *et al.*, 2020), extração acelerada de solventes (Loarce *et al.*, 2021), extração pressurizada de fluido (Saldña *et al.*, 2021) e extração assistida por micro-ondas (Moro *et al.*, 2021). A aplicação destas técnicas objetiva principalmente reduzir o tempo de extração e reduzir o consumo de solventes orgânicos (Crupi *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018). Além disso os métodos não convencionais podem diminuir a degradação da amostra, melhorar a eficiência e seletividade de extração e aumentar a sustentabilidade, melhorando a recuperação de componentes valiosos e reduzindo impactos negativos ao meio ambiente (Danlami *et al.*, 2014).

1.4.1 Extração convencional por solvente

A extração convencional com uso de solvente é a técnica mais difundida aplicada em escala industrial para extrair compostos bioativos de matrizes vegetais (Vieira *et al.* 2017). A utilização de solventes é conveniente, uma vez que o solvente fornece um portador físico para transferir as moléculas-alvo entre diferentes fases. Os compostos fenólicos são facilmente solubilizados em misturas hidroalcólicas, enquanto frações correspondentes de polifenóis podem ser obtidas com base na polaridade variando a concentração de álcool (Galanakis *et al.*, 2013; Tsakona *et al.*, 2012).

O tipo de solvente utilizado para extração é uma das variáveis mais importantes no processo de extração. A extração de polifenóis depende de dois mecanismos: (1) a dissolução de cada composto fenólico na matriz de material vegetal e (2) sua difusão no meio solvente externo (Kallithraka *et al.* 1995). O uso de um único solvente, como acetona ou metanol, proporciona um alto rendimento de extrato com baixa atividade antioxidante e baixo poder redutor, enquanto misturas de solvente e água dão os resultados opostos (Jayaprakasha *et al.* 2001). Além disso, altas concentrações de um único solvente também aumentam o custo de extração e limitam a temperatura de operação devido às suas volatilidades (Shi *et al.* 2005). Vários solventes hidroalcoólicos têm sido reivindicados como o melhor solvente para a máxima extração qualitativa e quantitativa de polifenóis a partir de subprodutos do vinho. Estes incluem o etanol (Spigno; Tramelli; De Faveri, 2007), metanol (Pinelo *et al.* 2005) e acetona (Baydar *et al.*, 2007).

O etanol é o solvente mais escolhido porque é barato e possui o status “GRAS - Geralmente reconhecido como seguro” (do inglês: *Generally-Recognized-As-Safe*, de acordo com a *American Food and Drug Administration*). Por outro lado, para compostos lipossolúveis como por exemplo os carotenoides, são utilizados solventes polares apróticos ou não polares como acetona ou acetato de etila (Strati; Oreopoulou, 2011). Neste caso, o solvente deve ser completamente removido de o extrato antes de poder ser usado em produtos alimentícios.

1.4.2 Extração com líquido pressurizado (ELP)

O método de extração de líquido pressurizado (ELP) ou extração por solvente acelerado (ESA) é uma técnica emergente que realiza extrações rápidas e eficientes sob condições de alta temperatura (até 200 °C) e pressão (até 200 bar), garantindo que o solvente utilizado permaneça líquido acima de seu ponto de ebulição, mas abaixo de seu ponto crítico (Mustafa; Turner, 2011). A combinação de tecnologias verdes e solventes verdes torna o ELP uma tecnologia ambientalmente correta que vem sendo amplamente pesquisada para a extração e recuperação de compostos fenólicos, como antocianinas por exemplo (Del Pilar *et al.*, 2017; De Sousa Sabino *et al.*, 2021). O ELP proporciona melhores resultados para a recuperação desses compostos do que os métodos convencionais, pois reduz a viscosidade e a tensão superficial do solvente e favorece a solubilização dos compostos de interesse, permitindo alta penetração do solvente líquido na matriz sólida (matéria-prima) e aumentando a difusidade e transferência de massa, melhorando o desempenho da extração. Como o sistema é fechado, as reações oxidativas ou fotodegradação são minimizadas apesar das altas temperaturas (Santos *et al.*, 2012; Mustafa; Turner, 2011).

Quando comparado às técnicas convencionais, o ELP apresenta algumas vantagens, como por exemplo, curto tempo de operação e redução na quantidade de solvente, o que minimiza os impactos ambientais. No entanto, o equipamento e a sua manutenção possuem custos altos, o que é compensando com a eficiência do método em aumentar o rendimento da extração (Machado, 2015; Oliveira, 2018).

Em termos de operação, o processo de extração do sistema ELP pode ser configurado nos modos dinâmico e estático. No modo dinâmico, o solvente é bombeado continuamente, através de uma vazão constante, para a célula extratora durante um período de tempo estabelecido e a recuperação do extrato é realizada pela válvula de saída da célula de extração que é mantida aberta. Na configuração estática, o processo é composto por diferentes ciclos de extração, para a substituição do solvente (por exemplo, 2- 3 ciclos), onde o solvente preenche a célula extratora, enquanto que a válvula de saída da célula de extração é mantida fechada, fazendo com que o solvente permaneça em contato com a amostra durante um tempo pré-estabelecido (Heng *et al.*, 2013; Mustafa; Turner, 2011). Por evitar a saturação do solvente, o modo dinâmico é considerado um modo de operação mais eficiente, uma vez que demanda de menos tempo e apresenta rendimento de extração igual ou até superior quando comparado ao modo estático. O modo estático depende intrinsecamente do binômio tempo/temperatura, para um bom rendimento de extração, no entanto, devido ao maior tempo de contato entre as fases proporciona maior penetração do solvente na matriz (Nieto *et al.*, 2010; Santos, 2018).

Os solventes mais utilizados para extração com líquidos pressurizados são: metanol, isopropanol, acetona, hexano e éteres. No entanto, como o etanol e a água são considerados solventes “verdes”, eles têm sido utilizados nos últimos anos para a extração de compostos bioativos (Teixeira *et al.*, 2021). De modo geral, ELP é uma técnica alternativa que apresenta menor consumo de solvente e menor tempo de extração em relação a técnicas convencionais, sendo reconhecida por diversos pesquisadores como uma tecnologia verde (Mustafa; Turner, 2011).

O método ELP é altamente eficaz na extração de compostos fenólicos e vem sendo aplicado em diferentes matrizes como cascas de jabuticaba (Santos *et al.*, 2012), café (Oliveira *et al.*, 2018), cascas de feijão preto (Teixeira *et al.*, 2021), açaí (Maciel-Silva *et al.*, 2022), farelo de arroz preto (Leonarski *et al.*, 2023) e subprodutos de frutas (Benvenuti *et al.*, 2022). A técnica de extração por líquido pressurizado também já foi aplicada em subprodutos da vinificação, principalmente no que se refere ao bagaço de uva, sementes e cascas de uvas (Garcia-Jares *et al.*, 2015; Otero-Pareja *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2019).

Alvarez-Casas *et al.* (2016), caracterizaram o bagaço de uva provenientes de variedades brancas autóctones (como Albariño, Caiño blanco, Godello, Loureiro, Torrontes e Treixadura) e não autóctones como Chardonnay, Gewürztraminer, Pinot blanc, Pinot gris, Riesling e Sauvignon blanc) cultivadas na Espanha, com foco na composição fenólica e na atividade antioxidante através da extração por líquido pressurizado. Os resultados mostraram diferenças significativas na composição fenólica e na capacidade antioxidante dos bagaços de uva das diferentes variedades brancas e indicaram que o ELP é uma técnica adequada para a extração de compostos fenólicos de bagaço de uva, com recuperação igual ou superior a outras técnicas, mas com menor consumo de solvente e tempo de extração.

A otimização do método ELP para maximizar a recuperação de compostos fenólicos do bagaço de uva também foi investigada. As variáveis independentes selecionadas foram temperatura, composição do solvente extrator (% etanol) e tempo de extração, enquanto as variáveis de resposta foram o rendimento de extração e a recuperação de compostos fenólicos. Os resultados mostraram que o ELP proporcionou uma recuperação significativamente maior de compostos fenólicos em comparação com a extração sólido-líquido convencional. As condições ideais foram na temperatura de 130 °C, 55% de etanol e 22 minutos de extração. O ELP também resultou em maiores rendimentos de extração de compostos fenólicos totais (Perra *et al.*, 2023).

A utilização da extração por líquido pressurizado também foi analisada para a recuperação de compostos fenólicos e ácidos graxos a partir de sementes de uva. O ELP alcançou rendimentos superiores para ambos os tipos de compostos, devido à sua alta capacidade de polarização e ponto de ebulição favorável. A técnica não apenas maximiza a recuperação de compostos fenólicos, preservando sua capacidade antioxidante, mas também extrai ácidos graxos essenciais, como o ácido linoleico e o ácido oleico, em concentrações que atendem às especificações da legislação brasileira (Freitas *et al.*, 2013).

A extração por líquido pressurizado tem sido amplamente aplicada na recuperação de compostos bioativos a partir do bagaço de uva. No entanto, há uma lacuna significativa na literatura quanto à aplicação desta tecnologia especificamente nas borras de vinho, que são outro subproduto relevante da vinificação. A investigação do ELP para a extração de compostos bioativos das borras de vinho representa uma oportunidade promissora para explorar plenamente o potencial de todos os subprodutos da indústria vitivinícola, promovendo a sustentabilidade e a inovação tecnológica no setor.

1.4.3 Crioconcentração

A crioconcentração (com o prefixo “crio” do grego krúos que significa “frio”, “frio do gelo”) é um processo utilizado para concentrar produtos líquidos por meio do congelamento prévio seguido de uma separação de cristais de gelo puros. A cristalização da água é a base da separação, na qual a solução se concentra pela remoção da fração de gelo e, consequentemente, os teores de sólidos solúveis da composição aumentam (Morison; Hartel, 2018; Sánchez *et al.*, 2011). A crioconcentração é um processo recente, com diversos estudos sobre sua aplicação, tecnologia e benefícios em diferentes matrizes, inclusive em subprodutos (Samsuri *et al.*, 2020; John *et al.*, 2023). É uma tecnologia altamente eficaz na concentração de sucos (Sánchez *et al.*, 2009), vinho (Park *et al.*, 2020), cerveja (Osorio *et al.*, 2023), café (Moreno *et al.*, 2014) e chá (Meneses *et al.*, 2021), preservando todos os componentes.

Devido às baixas temperaturas, a crioconcentração é considerada uma tecnologia interessante às indústrias para concentrar produtos ricos em proteínas e enzimas, vitaminas e compostos fenólicos, os quais podem ser reduzidos ou até mesmo inativados em temperaturas elevadas (Aider; De Halleux, 2009; Sánchez *et al.*, 2011). Além disso, o aroma e as características sensoriais dos produtos são mantidos uma vez que os compostos voláteis e os pigmentos são preservados (Morison; Hartel, 2018).

A aplicação da crioconcentração resultou na retenção significativa de compostos aromáticos no suco de maçã. A crioconcentração manteve 57 dos 97 compostos aromáticos originais encontrados no suco fresco e gerou 37 novos compostos de sabor. Além disso, a avaliação sensorial revelou que os avaliadores tiveram dificuldades em diferenciar o suco fresco do suco crioconcentrado. A crioconcentração demonstrou ser um método eficaz para manter a qualidade do sabor no suco de maçã, o que evidencia seu potencial para aplicações na produção de novo produtos concentrados de alta qualidade (Yoda, Miyaki e Saito, 2021).

A técnica de separação do gelo e do produto concentrado pode ser realizada por diversas técnicas, mas o princípio de funcionamento envolve a diminuição da temperatura do produto líquido até abaixo do seu ponto de congelamento com a finalidade de evitar o ponto eutético da solução, no qual todos os componentes do produto se solidificam instantaneamente. Quando há o congelamento controlado de soluções aquosas, os cristais de gelo de água se formam acima do ponto eutético, elevando a pureza da água cristalizada e preservando todas as características da solução original (Hartel; Chung, 1993). Em relação ao produto líquido inicial, a concentração é de aproximadamente duas vezes, dependendo da matriz e da composição de sólidos solúveis do produto. Este princípio básico pode ser realizado mais de uma vez, visando maior

concentração do produto. No entanto, isto irá depender da composição do alimento, da finalidade e do rendimento de cada etapa. Na crioconcentração, há três mecanismos básicos para a formação dos cristais de gelo na solução de interesse: cristalização em suspensão, crioconcentração em blocos e crioconcentração em camada (Aider; Halleux, 2009; Aider; Halleux; Akbache, 2007).

O mecanismo da crioconcentração em blocos, consiste no congelamento total ou parcial da solução líquida seguida pelo descongelamento parcial pelo método de descongelamento gravitacional assistido ou outras técnicas, como vácuo ou microondas. Este método produz duas frações: a fração concentrada (solução mãe) e a fração de gelo que contém a menor quantidade de matéria seca. A eficiência desse processo é determinada pela quantidade de impureza no gelo (Aider; Halleux; Akbache, 2007). No método parcial, uma solução ou alimento líquido é introduzido em uma câmara de cristalização para um congelamento parcial da fração central. Nesta etapa um tubo com um agente refrigerante é introduzido à solução para diminuir a temperatura central e iniciar a nucleação dos cristais de gelo. Com o aumento do bloco de gelo formado, aumenta o teor de sólidos solúveis do concentrado. A força motriz neste princípio é a gravitacional, com as diferenças de densidade entre gelo e concentrado fundamentais para uma separação eficiente, com o mínimo de perdas de sólidos solúveis (Heldman; Lund; Sabliov, 2018; Aider; De Halleux, 2009).

A crioconcentração total em blocos é promissora em termos de preservação de compostos e características sensoriais dos alimentos, e por necessitar apenas de força gravitacional durante o processo, são utilizados equipamentos simples e de fácil operação, resultando no menor custo total (energia, operacional e equipamentos) de todos os processos (Orellana-Palma *et al.*, 2017).

1.5 BIOACESSIBILIDADE DE COMPOSTOS BIOATIVOS E DIGESTÃO *IN VITRO*

A biodisponibilidade pode ser definida como a proporção do composto ingerido que é absorvido e metabolizado por vias normais de absorção, como o trato gastrointestinal ou intestino delgado por exemplo (Sengul *et al.*, 2014). Entre os fatores que determinam a biodisponibilidade de compostos bioativos está a bioacessibilidade, definida como a fração de um composto que é liberado da matriz alimentar no trato gastrointestinal e se encontra potencialmente disponível para absorção e metabolização (Shahidi e Peng, 2018). O termo bioatividade abrange o processo de como o composto é transportado até o tecido-alvo através da circulação, a interação com biomoléculas nesses tecidos e todos os efeitos biológicos gerados

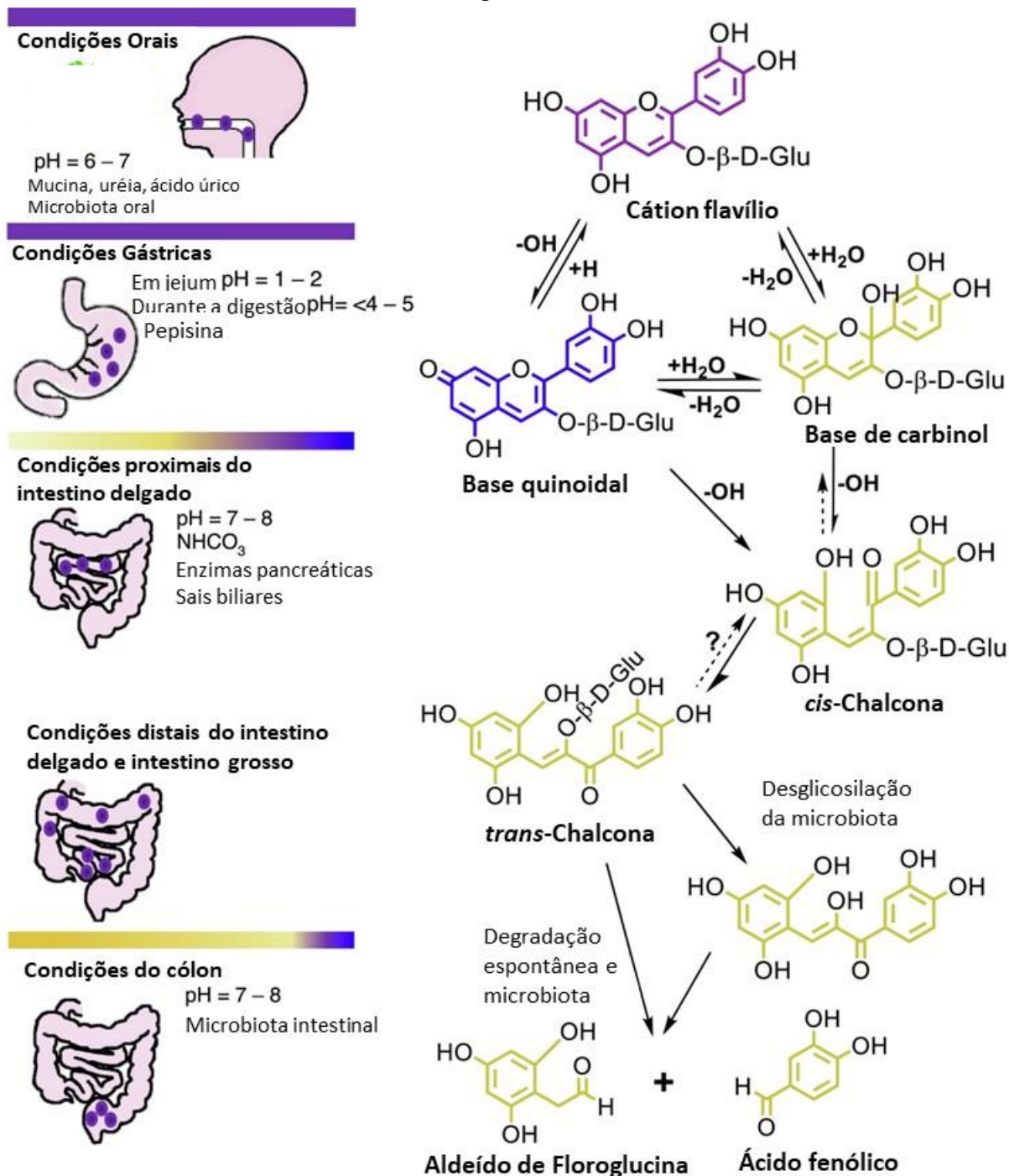
(Gutiérrez-Grijalva *et al.*, 2016). Os compostos bioativos presentes nos alimentos podem proporcionar benefícios ao corpo humano quando alcançam os tecidos específicos em concentrações que sejam biologicamente ativos. Para que sejam absorvidos pela corrente sanguínea, esses compostos precisam ser liberados inicialmente da estrutura dos alimentos e transformados em formas que sejam bioacessíveis no sistema gastrointestinal (Carbonell-Capella *et al.*, 2014).

Ensaio de bioacessibilidade podem ser realizados através de modelos de digestão *in vitro* através da simulação dos processos digestivos para estudar possíveis alterações estruturais, digestibilidade e liberação de compostos bioativos sob condições gastrointestinais simuladas, utilizando modelos estáticos ou dinâmicos, com base no conhecimento da fisiologia digestiva humana (Calinoiu; Vodnar, 2018; Brodkorb *et al.*, 2019). Em geral, esses modelos consistem em três etapas: a fase oral, uma digestão com pepsina gástrica em pH ácido, seguida de uma digestão com pancreatina e sais biliares sob condições alcalinas. Para que os resultados sejam relevantes, o tempo de digestão e a temperatura de 37°C utilizada nesses modelos devem mimetizar as condições do organismo *in vivo* (Hur *et al.*, 2011). A fim de avaliar adequadamente os compostos bioativos, pesquisas utilizando métodos de digestão *in vitro* têm sido amplamente realizadas (Laya; Koubala, 2020).

Os compostos bioativos encontrados na dieta apresentam variações significativas em termos de biodisponibilidade e propriedades biológicas, portanto, nem sempre os compostos mais abundantes na dieta são os mais biodisponíveis. Diversos fatores influenciam a biodisponibilidade dos compostos bioativos, como as antocianinas por exemplo, fatores como a estrutura química, o grau de ionização, a complexidade da matriz alimentar e a presença de outros compostos ingeridos são frequentemente relatados (Neto *et al.*, 2017). Esta concepção é respaldada pela conhecida instabilidade das antocianinas no ambiente gastrointestinal. A estrutura da antocianina é suscetível a alterações pelo pH, o que pode resultar na formação de diferentes conformações e metabólitos durante o processo digestivo (Figura 1.4). Por exemplo, o cátion flavílio e as bases carbinol podem ser mais predominantes em fluidos gástricos ácidos, enquanto bases quinoidais e isoformas de chalconas incolores podem ser mais abundantes em condições neutras e alcalinas encontradas no intestino delgado. Agliconas, aldeídos de floroglucina, alguns ácidos fenólicos (fenilacético e fenilpropenóide) também foram identificados *in vivo* e *in vitro* como prováveis metabólitos digestivos de antocianina (Czank *et al.*, 2013; Mueller *et al.*, 2018). Modelo de digestão *in vitro* são úteis para elucidar os efeitos de fatores individuais nas alterações estruturais de compostos bioativos, incluindo antocianinas, antes da absorção (Braga *et al.*, 2018; Mueller *et al.*, 2018; Victoria-Campos *et al.*, 2013).

Com base em estudos sobre a bioacessibilidade de antocianinas realizados *in vivo* observou-se que as recuperações de antocianinas da dose ingerida foram inferiores a 2% (Kuntz *et al.*, 2015). Por outro lado, em análises *in vitro*, a bioacessibilidade das antocianinas geralmente varia entre 2% e 30%, embora o valor seja um pouco superior, ainda se considera uma baixa recuperação (Gao *et al.*, 2022; Nascimento *et al.*, 2023; Yuste *et al.*, 2019). Além disso, vários estudos com antocianinas demonstraram que a extensão da glicosilação e o número e tipo de alguns substituintes oxigenados alteram a sua estabilidade e absorção gastrointestinal (Braga *et al.*, 2018).

Figura 1.4 - Conformações estruturais de antocianinas em função das alterações de pH no trato gastrointestinal.



Fonte: Adaptado de Victoria-Campos *et al.* (2022).

De modo geral, a absorção das antocianinas da dieta é limitada, pois elas são pouco absorvidas no trato gastrointestinal após a ingestão e sofrem intensa biotransformação (Caicedo-Lopez *et al.*, 2019). Dessa forma, para uma avaliação adequada do papel biológico das antocianinas e outros polifenóis na saúde humana, é fundamental não apenas entender os

níveis de digestão, mas também a quantidade que se torna bioacessível. Somente os compostos fenólicos que são solubilizados e não degradados durante a digestão são verdadeiramente bioacessíveis e, portanto, potencialmente biodisponíveis (Caicedo-Lopez *et al.*, 2019).

Portanto, é importante analisar a bioacessibilidade de diversas fontes alimentares para incluir na alimentação produtos com propriedades funcionais e nutraceuticas. Do ponto de vista regulatório, segundo a ANVISA, produtos com propriedades funcionais e nutraceuticas são aqueles que, além das funções nutricionais básicas, produzem efeitos benéficos à saúde, como a redução do risco de doenças crônicas, fortalecimento do sistema imunológico, e melhoras no desempenho físico e mental. Para que um produto alegue essas propriedades, ele deve passar por um processo de avaliação que comprove sua eficácia e segurança, conforme estabelecido RDC nº 24/2011, RDC nº 27/2010 e RDC nº 240/2018. O reaproveitamento de subprodutos para extrair compostos com essas propriedades é permitido e seguem os mesmos critérios regulatórios de segurança e eficácia (ANVISA, 2018). O bagaço de uva e a borra de vinho possuem uma rica composição, por isso, é fundamental avaliar como esses compostos se comportam utilizando simulações *in vitro* do sistema gastrointestinal, a fim de compreender o impacto do processo digestivo na composição dos alimentos.

1.6 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO*

O consumo de alimentos de origem vegetal ricos em polifenóis tem sido associado a efeitos antiobesogênicos, anti-inflamatórios, anti-neurodegenerativos, anticancerígenos, antidiabéticos e cardioprotetores, esses efeitos são frequentemente atribuídos à presença de antocianinas nos alimentos (Cassidy, 2018; Li *et al.*, 2017). Os estudos com cultura de células *in vitro* desempenham um papel crucial na pesquisa científica, contribuindo para avanços significativos no conhecimento de potenciais benefícios para a saúde associados à ingestão de alimentos, pois permitem investigar e compreender processos biológicos complexos, como o crescimento, diferenciação, declínio e morte das células em um ambiente controlado. Esse método possui vantagens em comparação com estudos em organismos *in vivo*, como a capacidade de controlar fatores como pH, temperatura, pressão osmótica e níveis de CO₂ e O₂ (Hur *et al.*, 2011).

As células podem ser divididas em três categorias baseadas na sua morfologia, sendo estas as células fibroblásticas, epiteliais e linfoblastos. As células fibroblásticas possuem formas alongadas e crescem ligadas a um substrato, as células epiteliais crescem em um substrato e são poligonais com dimensões mais regulares e as células de linfoblastos são esféricas e geralmente

crecem em suspensão. As culturas celulares são categorizadas com base em sua capacidade de aderir a uma superfície específica, podendo desenvolver-se em camadas únicas (monocamadas) ou permanecer em suspensão. As células que se desenvolvem em monocamadas aderem a um substrato sólido, enquanto as células em suspensão no meio de cultura não se fixam ao substrato (Freshney, 2005).

Os polifenóis estão amplamente presentes na natureza e diversos estudos indicam o seu potencial antitumoral, e em particular a sua capacidade para inibir a proliferação das células cancerígenas, devido aos seus efeitos sobre a atividade celular (Toaldo *et al.*, 2016; Haas *et al.*, 2020). Há um notável interesse e investimento significativo no avanço e desenvolvimento de protocolos sustentáveis para extrair estes polifenóis de múltiplas fontes vegetais com o objetivo de produzir suplementos com maior concentração de compostos fenólicos em comparação com a sua fonte original. No entanto, foram relatados efeitos colaterais quando altas doses são consumidas (Cory *et al.*, 2018). Embora alguns suplementos contenham múltiplos compostos bioativos e polifenóis, pode-se supor que os efeitos colaterais associados aos suplementos sejam causados pelos compostos da família fenólica ou, se houver efeito sinérgico ao combiná-los, com outras vitaminas ou compostos isolados. Assim, diversos estudos utilizando ensaios *in vitro* são realizados com avaliação de diferentes doses de compostos bioativos para determinar sua citotoxicidade (Kueete *et al.*, 2016; Fidelis *et al.*, 2020).

Os ensaios de citotoxicidade desempenham um papel crucial na avaliação da atividade antitumoral de compostos químicos em linhagens celulares (Lopez-Corona *et al.*, 2022). Esses ensaios se baseiam no crescimento e multiplicação das células, sendo monitorados através de indicadores de crescimento que medem a coloração e a intensidade de cor, proporcionais ao número de células presentes. Além disso, a atividade antiproliferativa *in vitro* visa avaliar a capacidade de uma substância inibir a proliferação celular, especialmente em células cancerígenas. A identificação da morte celular em diferentes categorias morfológicas, como apoptose, necrose, autofagia ou associada à mitose, também é parte integrante desses estudos, fornecendo informações valiosas sobre os efeitos das substâncias testadas no comportamento celular e no potencial terapêutico (Taates, Sobel e Budd, 2008).

CAPÍTULO 2
RECUPERAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS POR PROCESSO DE
CRIOCONCENTRAÇÃO DO BAGAÇO DE UVA

O texto e os dados discutidos neste capítulo foram reproduzidos e adaptados para publicação em forma de artigo na Food Research International (ANEXO A)

RESUMO

O bagaço de uva é o principal resíduo sólido da indústria vinícola, contendo elevadas quantidades de compostos fenólicos. Considerando seu alto potencial, um processo de extração foi otimizado para máxima recuperação de antocianinas do bagaço de uva (*Vitis vinífera* L.) usando ácido cítrico como acidulante geralmente reconhecido como seguro (GRAS) em água. Volume de solvente (3,2–36,8 mL), tempo (14,4–165,6 min) e pH do solvente (1,12–4,48) foram as variáveis independentes, a concentração de antocianinas monoméricas totais foi a variável dependente estudada. Além disso, a melhor condição para obtenção do extrato rico em antocianinas foi submetida ao processo de crioconcentração em bloco gravitacional. O desempenho do processo foi avaliado e as frações concentradas e de gelo foram analisadas quanto às propriedades físico-químicas, teor de compostos bioativos e atividade antioxidante. Os efeitos de interação, lineares e quadráticos para volume e pH do solvente foram significativos pela análise de variância (ANOVA). O delineamento experimental permitiu prever a recuperação máxima de antocianinas (10 mL de solvente em pH 1,8). A composição bioativa do extrato otimizado de bagaço de uva foi influenciada pelo processo de crioconcentração. Após três estágios, os compostos fenólicos totais e as antocianinas monoméricas foram aproximadamente 4 e 5 vezes maiores que a condição inicial do extrato, respectivamente. Consequentemente, foi observado um aumento na atividade antioxidante. O aumento na concentração de compostos bioativos atingiu uma eficiência de processo de 93% (estágio 1) para compostos fenólicos e 91% (estágio 2) para antocianinas. Portanto, a extração à base de água foi otimizada, podendo ser considerado segura e de baixo custo e o extrato concentrado apresentou maiores concentrações de fenólicos totais e antocianinas, comparado ao extrato inicial.

Palavras-chaves: Extração verde; Antocianinas; Subprodutos.

1 INTRODUÇÃO

Um dos mais significativos subprodutos agroindustriais produzidos mundialmente é proveniente do processamento de uvas (Zacharof, 2017), principalmente da indústria vinícola, com 75 milhões de toneladas de uvas produzidas por ano. O subproduto mais relevante gerado no processo de vinificação é o bagaço, que é composto pelos caules, sementes e cascas obtidos após a prensagem. O bagaço é constituído principalmente por fibras, lipídios, proteínas, açúcares solúveis e diversos compostos fenólicos como catequinas, flavonóis, ácidos fenólicos e antocianinas (Beres *et al.*, 2017). Diante disso, o bagaço de uva representa uma fonte natural rica em antocianinas, oferecendo potencial para ser explorado no desenvolvimento de aditivos alimentares e na formulação de suplementos nutricionais.

As antocianinas desempenham um papel importante na indústria alimentícia, tanto como corantes naturais quanto como ingredientes funcionais. Seu potencial para promover a saúde e proporcionar benefícios antioxidantes tem impulsionado a pesquisa e o desenvolvimento de novas aplicações, permitindo aos consumidores desfrutar de alimentos sensorialmente atrativos e com valor agregado à saúde. No entanto, a cor e a estabilidade desses pigmentos são influenciadas pelo pH, luz, temperatura e outros fatores (He; Giusti, 2010). Esses fatores podem levar à degradação ou perda de antocianinas, resultando na diminuição de sua atividade biológica e nos benefícios à saúde. É importante preservar a integridade das antocianinas por meio de processos que minimizem sua exposição a condições desfavoráveis, como utilização de temperaturas moderadas, pH adequado, proteção da luz e redução do contato com oxigênio. Portanto, processos de extração e concentração economicamente atrativos, seguros e não poluentes para a recuperação desses compostos são relevantes (Bamba *et al.*, 2018).

A extração de compostos fenólicos e principalmente de antocianinas utiliza misturas de solventes orgânicos para romper estruturas celulares e obter esses compostos em um ambiente acidificado (Rodriguez-Saona; Wrolstad, 2001). A maioria desses solventes não é GRAS (geralmente reconhecido como seguro). Portanto, encontrar alternativas para recuperação de compostos bioativos através de metodologias verdes, como o uso de soluções de ácido cítrico em água para recuperação de antocianina, é de grande relevância. Além de determinar condições máximas de recuperação em condições ambientalmente corretas, planejamento de experimentos multivariados utilizando metodologia de superfície de resposta são uma tendência e podem ser muito úteis (Ferreira *et al.*, 2020). Portanto, o planejamento experimental em conjunto com a metodologia de superfície de resposta permite realizar, através de um pequeno

número de experimentos, uma investigação simultânea do efeito principal das variáveis experimentais e do efeito de sua interação na resposta desejada.

A demanda por novas tecnologias aplicadas à alimentação também tem sido considerada uma tendência de pesquisa e mercado, atraindo ainda mais consumidores para produtos inovadores (Ferrão *et al.*, 2016, Salnikova, Grunert, 2020). Tecnologias emergentes foram criadas nesta abordagem para manter ou, em certa medida, melhorar os compostos bioativos nos alimentos. Para promover a concentração de vários alimentos líquidos e para recuperar compostos termolábeis, processos de concentração como a crioc Concentração podem ser um método alternativo e acessível em comparação com um processo térmico tradicional (Balde; Aider, 2017, Correa *et al.*, 2018). Uma vez que o processo de concentração por congelamento é realizado em baixas temperaturas, em geral há perda mínima de compostos bioativos, podendo produzir um novo produto de alta qualidade (Orellana-Palma *et al.*, 2019, Petzold *et al.*, 2016).

As inovações da crioc Concentração têm sido associadas ao desenvolvimento na configuração de sistemas de um estágio (concentração por congelamento em bloco ou concentração por congelamento progressiva) do que sistemas convencionais de crioc Concentração (cristalização em suspensão), devido à etapa de separação mais simples (Petzold e Aguilera, 2009; Sánchez *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2011; Miyawaki *et al.*, 2012). Outra vantagem destes sistemas é a sua simplicidade tanto em termos de configuração como de operação do equipamento (Sánchez *et al.*, 2009). A crioc Concentração em bloco é baseada nos seguintes princípios: uma solução alimentar líquida é completamente congelada, toda a solução congelada é descongelada e a fração concentrada é então separada da fração de gelo por descongelamento gravitacional (Aider; De Halleux, 2008a, Aider; De Halleux, 2008b).

Este capítulo teve como objetivo otimizar as condições de volume, pH e tempo para extração de antocianinas do bagaço de uva utilizando solução aquosa de ácido cítrico. Na sequência, a melhor condição para obtenção de extratos ricos em antocianinas e compostos fenólicos do bagaço de uva foi submetida ao processo de crioc Concentração. O desempenho desse processo foi avaliado para fornecer alternativas de aproveitamento desse subproduto. Além disso, as frações do extrato foram caracterizadas quanto à concentração de compostos bioativos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 REAGENTES E PADRÕES

Padrões para ácido gálico, Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromato-2-carboxílico), reagente Folin-Ciocalteu e ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os reagentes: ácido cítrico, cloreto de potássio e acetato de sódio foram fornecidos pela Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Todos os reagentes utilizados são de grau analítico. A água ultrapura foi obtida de um sistema de água Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, Massachusetts, EUA).

2.2 AMOSTRAS

As amostras de bagaço de uva foram doadas por uma vinícola localizada em São Joaquim, Santa Catarina. Uva da variedade Montepulciano (*Vitis vinífera* L.) foi utilizada para a elaboração dos vinhos e para a obtenção dos subprodutos vinícolas. As uvas foram colhidas ao atingir a maturidade tecnológica (23,5°Brix) e encaminhadas para o processo de vinificação.

A fermentação alcoólica do mosto foi realizada junto com as partes sólidas da uva. Leveduras selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* (25 g/hL) foram inoculadas para promover a fermentação alcoólica. A fermentação alcoólica ocorreu com maceração concomitante durante 14 dias sob condições de temperatura controlada 20°C. Após esta etapa, ocorreu a prensagem (prensa pneumática com força de 1,4 bar), com a separação das partes sólidas do líquido, sendo nesta etapa realizada a coleta das amostras do bagaço de uva (Figura 2.1). Após coletadas, as amostras do bagaço foram armazenadas a -20 °C e transportadas para o laboratório de Bioquímica de Alimentos, no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Santa Catarina.

Figura 2.1 – Amostra de bagaço de uva Montepulciano (*Vitis vinífera* L.) coletado durante o processo de vinificação.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

2.2.1 Preparação do extrato

A preparação dos extratos do bagaço para crioconcentração foi realizada utilizando um planejamento central composto contendo quatro pontos centrais. Volume de solvente (mL) (X_1), tempo (min) (X_2) e pH do solvente (X_3) foram as variáveis independentes, e seus níveis codificados estão apresentados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Variáveis independentes e seus níveis utilizados para o planejamento experimental.

Fatores	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
X_1 Volume (mL)	3,2	10	20	30	36,8
X_2 Tempo (min)	14,4	45	90	135	165,6
X_3 pH	1,12	1,8	2,8	3,8	4,48

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O delineamento foi construído com base em um delineamento fatorial 3^3 com 4 repetições do ponto central para estimar o erro experimental, resultando em 18 experimentos, realizados em ordem aleatória. A concentração de antocianinas monoméricas totais (AMT), foi a variável dependente avaliada. Todas as extrações foram realizadas utilizando como solvente água destilada: ácido cítrico (v/v) e a quantidade de amostra foi fixada em 1g para todos os ensaios. Os coeficientes foram calculados por análise de regressão e sua significância foi verificada por meio de análise de variância (ANOVA).

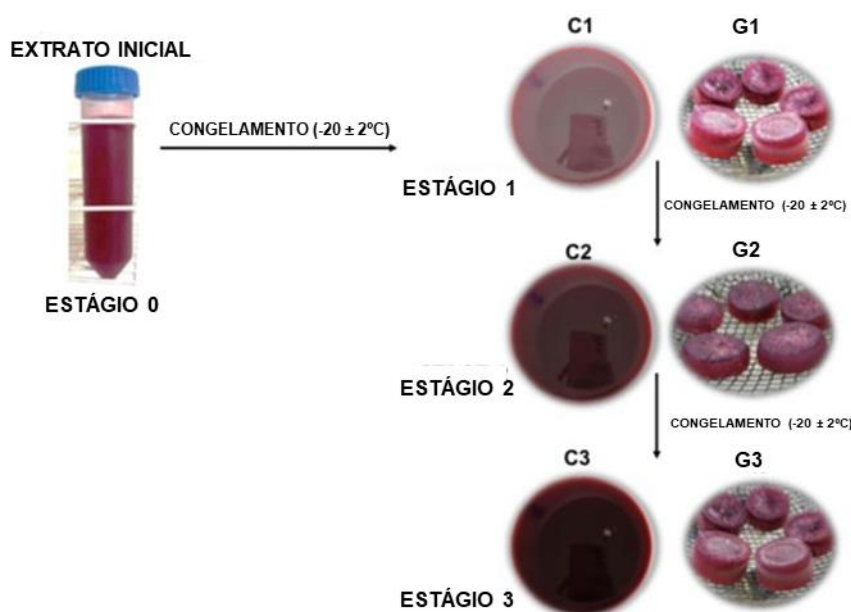
O extrato rico em antocianinas usado no processo de crioconcentração em bloco gravitacional foi obtido por extração sólido-líquido, sendo o solvente água destilada acidificada com ácido cítrico conforme resultados encontrados no planejamento experimental. Portanto, a preparação do extrato rico em antocianinas foi realizada na proporção de 500 g de bagaço de uva para 5 L de soluções de ácido cítrico em água destilada com pH 1,8 (1:10p/v). A suspensão foi mantida sob agitação constante por 45 min em sistema fechado à temperatura ambiente (20 °C). Posteriormente, o extrato foi filtrado e utilizado no processo de crioconcentração.

2.3 PROCESSO DE CRIOCONCENTRAÇÃO EM BLOCO GRAVITACIONAL

A concentração por congelamento em bloco foi realizada adicionando o extrato em recipientes plásticos de 200 mL e depois congelando a -20 ± 2 °C (Canela *et al.*, 2018). Após o extrato inicial estar completamente congelado, 50% do volume inicial foi descongelado à

temperatura ambiente (20 ± 2 °C), obtendo-se duas frações, o extrato concentrado (C1) e a fração gelo (G1) (Figura 2.2). O extrato concentrado descongelado (C1) foi utilizado como solução de alimentação para o segundo estágio, obtendo-se um segundo extrato concentrado (C2) e gelo (G2). Para o terceiro estágio, utilizou-se o extrato concentrado do estágio 2 (C2) para alimentar o próximo estágio do processo, obtendo-se um terceiro extrato concentrado (C3) e uma terceira fração de gelo (G3). Uma porção de cada estágio (C1, C2 e C3) e frações de gelo (G1, G2 e G3) foram coletadas e armazenadas a -20 ± 2 °C para posterior análises.

Figura 2.2 - Esquema visual da Crioconcentração em bloco realizada com o extrato inicial do bagaço de uva em três estágios.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

C1, C2 e C3 referem-se a concentrados dos estágios 1, 2 e 3, respectivamente; G1, G2 e G3 referem-se a frações de gelo dos estágios 1, 2 e 3, respectivamente.

2.3.1 Parâmetros da crioconcentração

O desempenho da crioconcentração foi avaliado pelo cálculo do fator de concentração (FC) para os sólidos solúveis totais (SST), antocianinas monoméricas totais (AMT), compostos fenólicos totais (CFT) e para atividade antioxidante (AA) de acordo com Aider e Ounis (2012), pelas seguintes **Equação 2.1, 2.2, 2.3 e 2.4 respectivamente**:

$$\text{Fator de Concentração} = \frac{SST_n}{SST_0} \quad (2.1)$$

Onde SST_n é o teor total de sólidos solúveis (g/ 100 mL) do extrato concentrado e SST_0 é o teor de sólidos solúveis totais (g/ 100 mL) do extrato inicial.

$$Fator\ de\ Concentração = \frac{AMT_n}{AMT_0} \quad (2.2)$$

Em que AMT_n é o teor total de antocianinas (mg/ L) do extrato concentrado e AMT_0 é o teor total de antocianinas (mg/ L) do extrato inicial.

$$Fator\ de\ Concentração = \frac{CFT_n}{CFT_0} \quad (2.3)$$

Onde CFT_n é o conteúdo fenólico total (mg/ L) do extrato concentrado e CFT_0 é o teor fenólico total (mg/ L) do extrato inicial.

$$Fator\ de\ Concentração = \frac{AA_n}{AA_0} \quad (2.4)$$

Onde AA_n é o conteúdo de atividade antioxidante (TEAC μ mol/L) do extrato concentrado e AA_0 é o conteúdo de atividade antioxidante (TEAC μ mol/L) do extrato inicial.

A eficiência do processo (EP) foi calculada com base no aumento dos sólidos solúveis totais (SST) no extrato concentrado (g/ 100 mL) em relação ao SST remanescente no gelo (g/ 100 mL) para os três estágios da crioconcentração, de acordo com a **Equação 2.5**:

$$Eficiência\ do\ Processo\ (\%) = \frac{SST_c - SST_I}{SST_c} \times 100 \quad (2.5)$$

Onde SST_C é o teor total de sólidos solúveis (g/ 100 mL) no concentrado, e SST_I o teor de sólidos solúveis totais (g/ 100 mL) no gelo no final de cada estágio de crioconcentração. Assim como para o Fator de Concentração, a Eficiência do Processo também foi calculada de acordo com os resultados das antocianinas totais e compostos fenólicos (mg/ L).

A impureza do gelo foi determinada pelos sólidos solúveis totais (g/ 100g) da fase concentrada que permanece na fração gelo. É definida como a razão entre a concentração de sólidos solúveis totais na fração de gelo e a concentração de sólidos solúveis totais de extrato

concentrado no final de cada ciclo. O índice de impureza para cada ciclo foi calculado de acordo com a **Equação 2.6**:

$$\text{Impureza do Gelo (\%)} = 100 (\%) - \text{Eficiência (\%)} \quad (2.6)$$

2.4 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

As análises físico-químicas foram realizadas com amostras de extrato inicial, extrato concentrado e frações de gelo. O pH foi determinado com pHmetro (pH meter 220 MP Mettler-Toledo) e os sólidos solúveis totais (°Brix) foram medidos a 25 °C (± 1 °C) em um refratômetro (Quick-Brix™ 220 90-Mettler Toledo). A intensidade e tonalidade da cor foram determinadas a partir de medidas de absorbância em 420, 520 e 620 nm em um espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi U2010, CA, EUA) (Glories, 1984).

2.5 DETERMINAÇÃO DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTAIS

As antocianinas monoméricas totais foram determinadas pelo método de pH diferencial (Giusti; Wrolstad, 2001), em um espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi U2010, CA, EUA), utilizando-se dois sistemas: tampão cloreto de potássio (pH 1,0) e tampão acetato de sódio (pH 4,5). Os valores de absorbância foram medidos no comprimento de onda de máxima absorção e a 700 nm. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes malvidina-3-glicosídeo (M3G) /L.

2.6 DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS

Os polifenóis totais foram determinados em um espectrofotômetro U2010 Hitachi UV-Vis usando o ensaio de Folin-Ciocalteu, de acordo com Singleton e Rossi (1965). A absorbância das amostras foi medida a 760 nm e os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg GAE/L).

2.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante *in vitro* foi avaliada utilizando o método de captura de radicais livres de acordo com Re *et al.* (1999), usando o radical ABTS (ácido 2,2-azino- bis (3-

etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico) com leitura espectrofotométrica em 754 nm em um espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi U2010, CA, EUA). Os resultados foram expressos em equivalente de Trolox (TEAC) ($\mu\text{mol/L}$).

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. A análise dos dados foi realizada utilizando o software STATISTICA 13.5 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, EUA). Para determinar as diferenças significativas ($p < 0,05$), foi aplicada análise de variância (ANOVA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS DO BAGAÇO DE UVA

A significância dos fatores foi confirmada pela análise de variância (ANOVA) (Tabela 2.2), onde foi possível observar que entre todos os fatores avaliados o volume de solvente água: solução de ácido cítrico e o pH foram significativos ($p < 0,01$). O modelo foi significativo ($p < 0,01$) e não apresentou falta de ajuste ($p_{\text{falta de ajuste}} = 0,014$), indicando que o modelo descreveu os efeitos da variável dependente com boa preditividade. O modelo R^2 ajustado conseguiu explicar mais de 71 %. De acordo com o modelo proposto, o efeito linear do volume de solvente água: solução de ácido cítrico e o efeito linear e quadrático do pH afetaram significativamente o teor de antocianinas monoméricas totais (variável dependente), enquanto o efeito linear foi negativo para a resposta o efeito quadrático contribuiu positivamente para o teor de antocianinas. A variável tempo de extração não apresentou efeito significativo.

Tabela 2.2 - Análise de variância da extração de antocianinas monoméricas totais de bagaço de uva.

	SS	DF	QM	F-valor	p-valor
Volume (L)	7594,02	1	7594,02	362,51	0,000316
Volume (Q)	698,16	1	698,16	33,33	0,010333
pH (L)	5680,35	1	5680,35	271,16	0,000487
pH (Q)	2620,10	1	2620,10	125,07	0,001532
Falta de ajuste	4813,72	11	437,61	20,89	0,014620
Erro puro	62,85	3	20,95		
Total SQ	20771,03	17			

DF, graus de liberdade; QM, quadrado médio; L, efeito linear; Q, efeito quadrático. A linha em negrito apresenta diferença significativa ($p < 0,01$). Fonte: Elaborado pela autora (2023).

As variáveis independentes que foram significativas ($p < 0,01$), representadas por seus coeficientes lineares e quadráticos são apresentadas na Tabela 2.3.

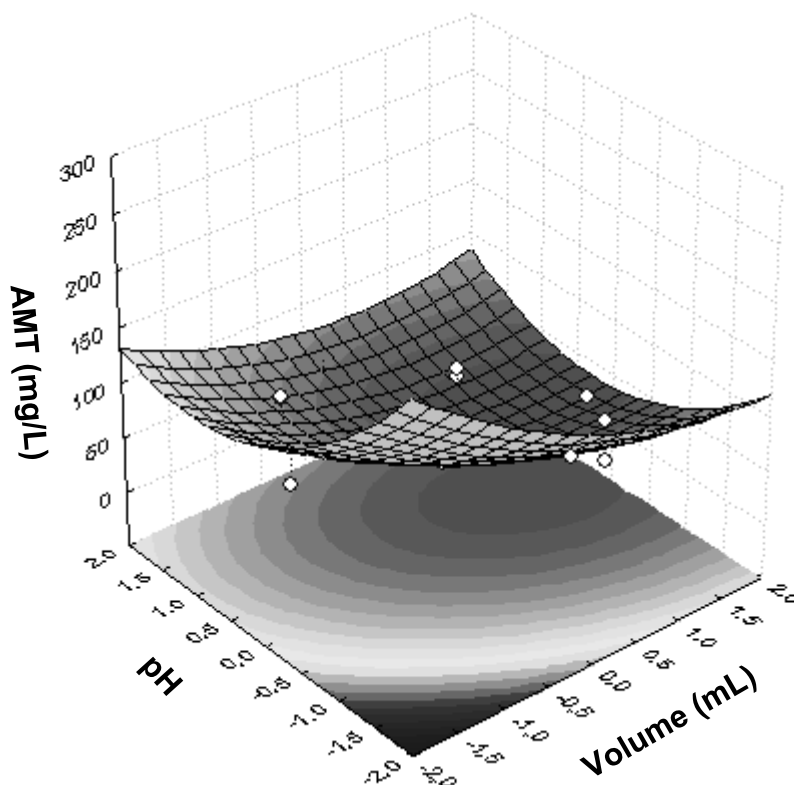
Tabela 2.3 - Efeitos das variáveis independentes volume e pH de solvente sobre o teor de antocianinas monoméricas totais do extrato do bagaço de uva.

Fatores	Coef. de Regressão	Erro Padrão	t-valor	p-valor	-99% de confiança	+99% de confiança
Constante	276,4303	9,831590	28,1165	<0,0001	219,005	333,8557
X₁	-2,3591	0,123906	-19,0397	<0,0003	-3,083	-1,6354
X₃	-98,1643	7,062622	-13,8991	<0,0008	-139,416	-56,9122
X₃²	13,8859	1,241622	11,1837	<0,001	6,634	21,1381

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A superfície de resposta para o modelo de regressão ajustado aos dados está representada na Figura 2.3.

Figura 2.3 - Gráfico de superfície de resposta para avaliar o efeito do volume de solvente e pH na extração de antocianinas monoméricas totais.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Com base no modelo proposto, o efeito linear negativo do volume de solvente (X_1) indica uma redução significativa ($p < 0,05$) no teor de antocianinas, enquanto o efeito linear positivo do pH do solvente (X_3) fez com que o teor aumentasse. O efeito quadrático negativo do pH do solvente (X_3^2), indicou que houve um máximo na taxa de extração de antocianinas até um determinado nível, onde passou a ser reduzida, possivelmente devido à degradação dos compostos em pH neutro ou alcalino (Fossen, et al., 1998; Liu et al., 2018). A acidificação melhora a capacidade do solvente de romper as membranas celulares dos tecidos vegetais e dissolver os pigmentos. Adicionalmente, um solvente mais ácido estabiliza cátion *flavilium*, AH^+ , o que ajuda a manter a coloração das antocianinas, evitando mudanças indesejadas na cor (Samota et al., 2022).

Observou-se que a menor concentração de antocianinas está em regiões com altos valores de volume de solvente e pH, a resposta mínima para extração de antocianinas foi de 40mg/L e foi obtida com um volume de solvente de 30mL, com um tempo de extração de 45 minutos e um pH de 3,8. Assim, a predição da combinação ótima seria considerar uma resposta em um ponto mínimo. No entanto, a resposta máxima para extração de antocianinas de acordo com o planejamento, foi obtida com 10 mL de solução de água:ácido cítrico, com um tempo de

extração de 45 minutos e um pH de 1,8. Nessas condições, obteve-se um teor de antocianinas monoméricas totais de 154,79 mg/L para o bagaço de uva (dados não mostrados).

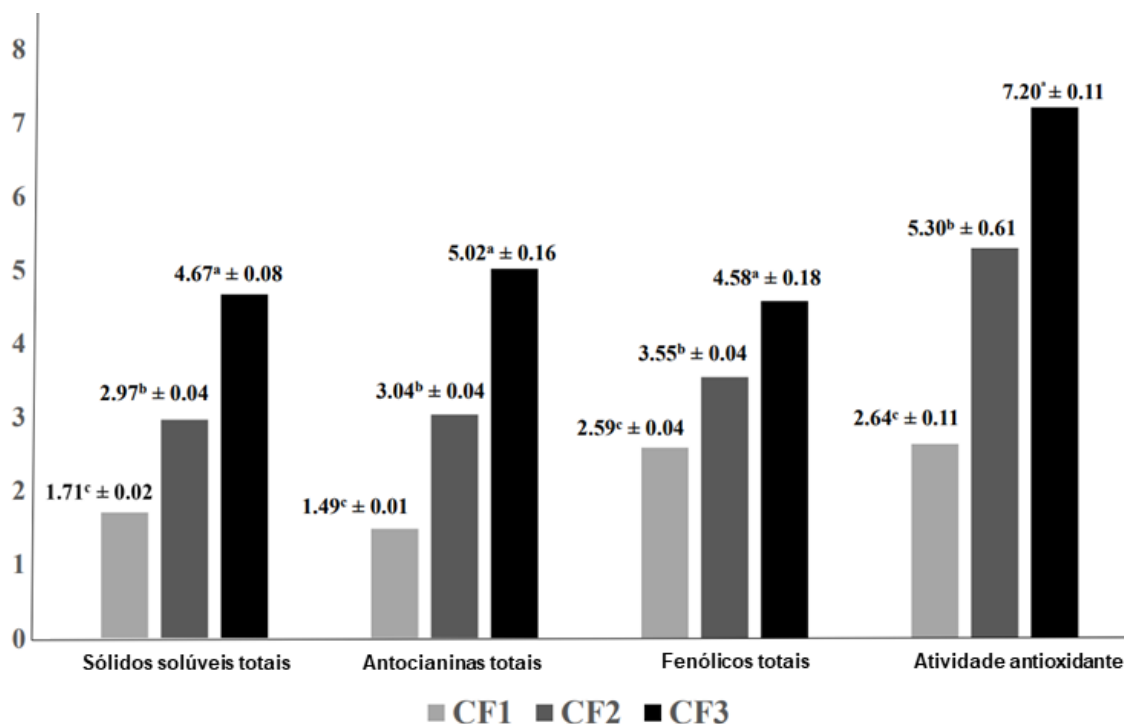
Romero-Díez *et al.* (2019) avaliaram a influência da relação sólido-líquido de solvente extrator utilizado em subprodutos da vinificação para quantificação das antocianinas, observaram que o rendimento da extração de antocianinas aumentou à medida que a relação sólido-líquido diminuiu. Além disso, o uso de grandes volumes de solventes implica diretamente em questões econômicas e ambientais (Drosou *et al.*, 2015). É importante ressaltar que poucos estudos testaram diferentes condições de razão sólido líquido, pH e tempo de extração para recuperar antocianinas do bagaço de uva por metodologias verdes. Portanto, é de grande relevância determinar as condições máximas de recuperação utilizando delineamentos experimentais multivariados pela metodologia de superfície de resposta, fornecendo uma compreensão de como a combinação dessas variáveis irá impactar o processo.

O delineamento experimental permitiu prever a recuperação máxima de antocianinas monoméricas totais do bagaço de uva nas seguintes condições: volume de solvente água: solução de ácido cítrico de 10 mL e pH do solvente de 1,8. Então nessas condições foi realizada a preparação do extrato para aplicação do processo de crioconcentração em seguida o desempenho do processo foi avaliado.

3.2 DESEMPENHO DO PROCESSO DE CRIOCONCENTRAÇÃO DO EXTRATO DO BAGAÇO DE UVA

A Figura 2.4 apresenta o fator de concentração (FC) obtido para o extrato do bagaço submetido a três estágios de crioconcentração quanto ao teor de antocianinas monoméricas totais, sólidos solúveis, polifenóis totais e atividade antioxidante.

Figura 2.4 - Resultados do fator de concentração (CF) de sólidos solúveis totais (°Brix), antocianinas monoméricas totais (mg/L), teor de fenólicos totais (mg/L) e atividade antioxidante (TEAC $\mu\text{mol/L}$) analisada em cada um dos três estágios do processo de crioconcentração (1,2,3).



^{a, b, c} Diferentes letras minúsculas sobrescritas para o mesmo tipo de análise denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras. Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Foi possível observar que o FC obtido para todas as análises foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) para cada estágio de concentração. De acordo com Petzold *et al.* (2016), o fator de concentração avalia a disponibilidade de realizar vários estágios de concentração em blocos, portanto, demonstra quantas vezes o concentrado inicial da solução aumentou para cada fração coletada.

Pode-se observar que o fator de concentração para as antocianinas monoméricas totais aumentou 104,02% de C1 para C2, 65,13% de C2 para C3 e até 236,90% de C1 para C3. Para os polifenóis totais aumentou 37,06 % de C1 para C2, 29,01% de C2 para C3 e até 76,83% de C1 para C3. A atividade antioxidante também apresentou o mesmo comportamento para o fator de concentração, aumentando 100,75% de C1 para C2, 35,84 % de C2 para C3 e até 172,72 % de C1 para C3. Estes resultados demonstram que o processo de três estágio reteve não apenas altas concentrações de sólidos solúveis, mas também altas concentrações de antocianinas, fenólicos e atividade antioxidante. Estudo realizado por Hass *et al.* (2022) aplicaram o processo de crioconcentração em bloco de três estágios para o enriquecimento de suco de laranja e

observaram através do valor do fator de concentração que foi possível manter elevado teor de polifenóis no suco crioconcentrado.

Os resultados de sólidos solúveis totais, antocianinas totais, teor de fenólicos totais, atividade antioxidante do extrato inicial, frações concentradas (C) e frações de gelo (G) para cada um dos três estágios do processo de congelamento são apresentados na Tabela 2.4. É notável que houve um aumento progressivo dos compostos à medida que os estágios da crioconcentração progrediu. Em relação às antocianinas, o processo de crioconcentração variou de 112,79 (mg/L) para 566,81 (mg/L), aumentando em 5 vezes o teor de antocianinas monoméricas totais em relação ao extrato inicial. Além disso, o gelo obtido no terceiro estágio (G3), apresentou maior teor de antocianinas que o extrato inicial, variando de 112,79 (mg/L) para 133,64 (mg/L), respectivamente. Esse comportamento pode ser explicado pela formação de ligações de hidrogênio com a água, onde os compostos podem permanecer aprisionados nas moléculas de água sendo assim transportados para a fase de gelo. Estes resultados estão de acordo com dados publicados na literatura para o processo de congelamento do suco de mirtilo (Casas-Forero *et al.*, 2020) e do suco de morango (Adorno *et al.*, 2017), onde a fração concentrada e o gelo apresentaram maior teor de antocianinas do que a amostra inicial.

Tabela 2.4 - Resultados do teor de sólidos solúveis totais, antocianinas totais, fenólicos totais, atividade antioxidante, eficiência do processo (EP) e impureza do gelo dos extratos iniciais, frações concentradas (C) e gelo (G) para cada um dos três estágios da crioconcentração.

Amostras	Sólidos solúveis totais (°Brix)	Antocianinas totais (mg/L)	Teor de fenólicos totais (mg/L)	Atividade antioxidante (TEAC $\mu\text{mol/L}$)
Extrato inicial	$4,8^e \pm 0,1$	$112,79^e \pm 0,01$	$276,19^e \pm 6,11$	$950,76^e \pm 2,02$
C1	$8,3^c \pm 0,1$	$168,81^c \pm 1,16$	$716,36^c \pm 3,71$	$2511,80^c \pm 101,$
G1	$0,9^g \pm 0,1$	$30,61^f \pm 0,86$	$49,36^g \pm 0,01$	$63,80^f \pm 4,62$
C2	$14,4^b \pm 0,1$	$342,95^b \pm 4,25$	$981,14^b \pm 11,37$	$5037,65^b \pm 584,$
G2	$1,6^f \pm 0,1$	$32,12^f \pm 1,04$	$119,82^f \pm 0,37$	$334,90^g \pm 36,1$
C3	$22,6^a \pm 0,1$	$566,81^a \pm 18,74$	$1264,09^a \pm 27,15$	$6853,24^a \pm 103,$
G3	$5,9^d \pm 0,1$	$133,64^d \pm 1,53$	$382,09^d \pm 8,16$	$1160,54^d \pm 71,1$
EP1 (%)	$88,40^A \pm 0,57$	$81,86^B \pm 0,52$	$93,11^A \pm 0,03$	$97,46^A \pm 0,20$
EP2 (%)	$88,55^A \pm 0,76$	$90,63^A \pm 0,85$	$87,78^B \pm 0,10$	$93,20^B \pm 1,67$
EP3 (%)	$73,95^B \pm 0,15$	$73,40^C \pm 0,99$	$69,76^C \pm 1,13$	$83,07^C \pm 0,81$
Impureza de gelo (%)	$11,59^+ \pm 0,57$	$18,13^+ \pm 0,52$	$6,89^u \pm 0,03$	$2,54^u \pm 0,20$
Impureza de gelo (%)	$11,45^+ \pm 0,76$	$9,35^u \pm 0,85$	$12,21^+ \pm 0,10$	$6,79^+ \pm 1,67$
Impureza de gelo (%)	$26,05^* \pm 0,15$	$23,66^* \pm 0,99$	$30,24^* \pm 1,13$	$16,92^* \pm 0,81$

a, b, c, d, e, f, g Dentro da coluna, diferentes letras minúsculas sobrescritas denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras. ^{A, B, C} Dentro da coluna, diferentes letras maiúsculas sobrescritas denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras. ^{*, +, u} Dentro da coluna, símbolos diferentes denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras.

O mesmo comportamento apresentado para o teor de antocianinas monoméricas totais também foi observado para os polifenóis totais, com um aumento progressivo na concentração à medida que os estágios do processo avançaram. O processo de crioconcentração apresentou um aumento dos polifenóis totais de 276,19 (mg/L) para 1264,09 (mg/L). De acordo com Zielinski *et al.* (2019), no processo de concentração por congelamento, cada estágio de desenvolvimento acarreta em perda de parte da água das amostras, acarretando no aumento do teor de compostos bioativos. Além disso, a manutenção de compostos fenólicos, como as antocianinas durante o processo é facilitada pelo uso de baixas temperaturas, uma vez que as antocianinas podem ser degradadas pelo calor (Casas-Forero *et al.*, 2020).

Geralmente, os extratos concentrados apresentam alto teor de compostos fenólicos e antocianinas e, conseqüentemente, maior atividade antioxidante. Essa afirmação foi corroborada neste estudo, uma vez que o processo de crioconcentração também aumentou a atividade antioxidante, em todos os estágios do processo. Foi possível obter um valor máximo de atividade antioxidante no último estágio do processo (C3), atingindo um aumento de cerca de 7 vezes quando comparado ao extrato inicial. Em nosso estudo, observou-se que a capacidade antioxidante também aumentou significativamente ($p < 0,05$) nas frações gelo, com as maiores concentrações verificadas para a fração G3. A capacidade antioxidante das frações de gelo no primeiro e segundo estágio foi significativamente diferente. Este resultado indica que a maioria dos compostos fenólicos e antocianinas foram perdidos neste estágio. Portanto, até o segundo estágio de concentração, as propriedades bioativas do extrato podem ser mantidas ou aumentadas na concentração da solução, com menor perda para a fração gelo.

A eficiência do processo (EP) obtida pelo processo de congelamento foi superior a 70% em todos os estágios, exceto no terceiro estágio para os fenólicos totais. Segundo Aider, Halleux e Akbache (2007) a EP é dependente da taxa de impurezas no gelo. Na Tabela 2.4, a maior taxa de impurezas no gelo foi encontrada no terceiro estágio do processo, o que corresponde a um menor EP. Para o teor de sólidos solúveis totais, a EP não diferiu significativamente entre o primeiro (88,40%) e o segundo estágio (88,55%), porém diminuiu significativamente no terceiro estágio (73,95%) do processo. Nesse caso, o primeiro estágio deve ser escolhido para reduzir o tempo e os custos envolvidos na concentração por congelamento em bloco, o que pode impactar em ganhos econômicos. O mesmo pode ser considerado em relação ao EP para a concentração de compostos fenólicos totais e para a atividade antioxidante, uma vez que apresentaram 93,11% e 97,46%, respectivamente, no primeiro estágio do processo de crioconcentração. Em relação às antocianinas monoméricas totais, a maior eficiência alcançada pelo processo foi de 90,63% no segundo estágio do processo

de crioconcentração. Portanto, em um processo industrial, a eficiência do processo pode ser avaliada para decidir em qual estágio (C1 ou C2) o processo pode ser interrompido, visando a redução de tempo e consumo de energia, de acordo com o composto de maior interesse.

3.3 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EXTRATO CONCENTRADO DE BAGAÇO DE UVA RICO EM ANTOCIANINAS E FRACÇÕES DE GELO

Os parâmetros de pH, intensidade de cor e tonalidade de cor são mostrados na Tabela 2.5. Os valores obtidos para pH variaram significativamente de acordo com o primeiro estágio da crioconcentração. O pH variou de 2,03 no extrato inicial a 1,56 em C3 e $2,66 \pm 0,01$ na fração G1 a $1,92 \pm 0,01$ no G3, demonstrando uma tendência a diminuir entre os estágios concentrados e a aumentar dependendo do estágio da fração gelo, mostrando que a crioconcentração também tem um efeito significativo sobre o pH das frações de gelo.

Tabela 2.5 - Resultados de pH, intensidade de cor e tonalidade dos extratos iniciais, concentrado (C) e frações de gelo (G) para cada um dos três estágios do processo de concentração por congelamento em bloco (1, 2, 3).

Amostras	pH	Intensidade da cor	Tonalidade da cor
Extrato inicial	$2,03^c \pm 0,01$	$7,88^d \pm 0,07$	$4,45^b \pm 0,12$
C1	$1,99^d \pm 0,01$	$9,41^c \pm 0,13$	$4,16^{bc} \pm 0,05$
G1	$2,66^a \pm 0,01$	$0,90^f \pm 0,15$	$5,16^a \pm 0,36$
C2	$1,71^f \pm 0,01$	$25,11^b \pm 0,7$	$3,70^d \pm 0,00$
G2	$2,36^b \pm 0,01$	$1,70^e \pm 0,04$	$4,49^b \pm 0,02$
C3	$1,56^g \pm 0,01$	$36,92^a \pm 0,12$	$3,89^{cd} \pm 0,01$
G3	$1,92^e \pm 0,01$	$8,13^d \pm 0,03$	$3,75^d \pm 0,01$

a, b, c, d, e, f, g Dentro da, diferentes letras minúsculas sobrescritas denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras. Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Outro parâmetro importante que pode ser associado à qualidade e à composição bioativa é a cor do extrato, uma vez que, em amostras que apresentam pigmentos provenientes das antocianinas, a intensidade da cor vermelha apresenta relação direta com o teor do pigmento. De acordo com os resultados apresentados, a intensidade da cor aumentou significativamente ($p < 0,05$) nos extratos concentrados até o terceiro estágio do processo de crioconcentração, o

que também foi observado nas frações do gelo, G1, G2 e G3 o mesmo comportamento. Estes resultados sugerem que houve perda dos constituintes do extrato para as frações de gelo no processo de crioconcentração, assim como foi observado para o teor de antocianinas (Tabela 2.4). Com estes resultados, pode-se observar que o extrato de bagaço de uva foi concentrado com altos teores de compostos bioativos sem perder a coloração. A manutenção da cor é um parâmetro importante para as características de qualidade de um produto alimentício. Os resultados desta pesquisa foram consistentes com estudos publicados na literatura para concentração de suco de mirtilo por congelamento (Orellana-Palma *et al.*, 2020) e concentração por congelamento assistido a vácuo do vinho tinto (Petzold *et al.*, 2016), em que as amostras concentradas apresentaram maior intensidade de cor do que a amostra inicial.

Esses resultados demonstram que a crioconcentração é uma opção valiosa para o uso do bagaço de uva que pode ser otimizado para preservar e concentrar os compostos bioativos deste subproduto. Deve-se notar que este é o primeiro relato do impacto do processo de crioconcentração em blocos em três estágios sobre os compostos bioativos do bagaço de uva, que são componentes de grande interesse industrial. Além disso, o processo efetivamente concentrou as antocianinas monoméricas totais no extrato de bagaço de uva, aplicando apenas a força da gravidade usando um aparato simples e barato em escala laboratorial, sem consumir energia para realizar o processo.

4 CONCLUSÃO

A aplicação de tecnologias limpas para a valorização dos subprodutos vitivinícolas avaliados neste estudo tem implicações práticas e significativas para a indústria de alimentos, uma vez que a reutilização destes subprodutos reduz o desperdício e minimiza o impacto ambiental associado à produção de vinho. Este estudo relatou a otimização das condições de extração de antocianinas do bagaço de uva utilizando solução de ácido cítrico. As condições que resultaram no teor máximo de antocianina foram alcançadas utilizando 10 mL de solvente em pH 1,8. Assim, a extração utilizou solvente não orgânico e seguro, resultando em um extrato de bagaço de uva rico em antocianinas.

O processo de crioconcentração demonstrou ser um método eficaz para concentração de compostos bioativos no extrato de bagaço de uva, o que pode ser creditado ao uso de baixa temperatura, permitindo a manutenção dos compostos bioativos do extrato de bagaço de uva. Todos os concentrados apresentaram maiores concentrações de fenólicos totais e antocianinas em relação ao extrato inicial. Esses compostos podem ser utilizados como ingredientes naturais

em alimentos funcionais, suplementos dietéticos e produtos nutricionais, agregando valor a novos produtos. Por último, é importante destacar que esta abordagem contribui para o progresso da economia circular na indústria alimentar, uma vez que a transformação dos subprodutos da vinificação em novos ingredientes cria uma cadeia de valor mais sustentável, onde os subprodutos são reutilizados em vez de descartados.

CAPÍTULO 3
RECUPERAÇÃO DE ANTOCIANINAS DE BORRAS DE VINHO USANDO
EXTRAÇÃO POR LÍQUIDO PRESSURIZADO COMO UMA ABORDAGEM VERDE

RESUMO

A utilização de subprodutos do vinho para aplicações industriais constitui um grande desafio. As borras de vinho, segundo subproduto do vinho em quantidade, representam uma fonte de compostos que podem ser explorados. O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes métodos para a extração das antocianinas presentes na borra do vinho tinto (*Vitis vinifera* L.), otimizando as condições para maximizar a recuperação de antocianinas através da extração por líquido pressurizado. As amostras de borra de vinho foram desidratadas em estufa com circulação de ar e avaliada quanto à cinética de secagem utilizando curvas de secagem à 40 °C. Após o processo de secagem, quatro métodos de extração: agitação orbital, ultrassom, agitação térmica e extração por líquido pressurizado foram aplicados para recuperação de antocianinas da borra de vinho seca. O planejamento central composto foi aplicado para a extração por líquido pressurizado, onde as variáveis independentes foram temperatura e proporção de solvente, e a variável resposta foi o teor de antocianinas monoméricas totais. Após as otimizar as condições de extração o extrato obtido foi caracterizado quanto à sua composição, propriedades bioativas e o seu potencial bioacessível e atividade biológica. Dentre os diferentes métodos de extração, observou-se que a extração por líquido pressurizado em modo estático apresentou maior teor de antocianinas monoméricas totais no extrato. O ponto ótimo de extração por ELP foi a 55 °C, utilizando solvente etanol:ácido cítrico (0,1 mol/L) na proporção de 50:50 (v/v). As antocianinas delphinidina-3-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo foram identificadas e devidamente quantificadas, sendo a malvidina a majoritária na borra do vinho. A análise da digestão *in vitro* do extrato de borras de vinho mostrou que as antocianinas são bioacessíveis na fase oral (90%) e gástrica (60%). Além disso o extrato não apresentou citotoxicidade para células L292 (500 µg/mL) e apresentou citoproteção (usando 500 µg/mL) quando submetidos ao estresse oxidativo com H₂O₂. Os resultados evidenciam o potencial das borras de vinho tanto do ponto de vista tecnológico como corante natural, quanto do ponto de vista bioativo, onde podem contribuir para a formulação de ingredientes com benefícios adicionais.

Palavras-chaves: Borra de vinho; Extrato rico de antocianinas; Otimização

1 INTRODUÇÃO

A indústria vitivinícola gera grandes quantidades de resíduos e subprodutos, ricos em compostos de alto valor, como podas de videira, engaços de uva, bagaço de uva e borras de vinho (Bordiga *et al.*, 2015). As borras de vinho são subprodutos acumulados no fundo dos tanques após a fermentação, armazenamento ou tratamento do vinho, elas constituem uma porcentagem significativa dos resíduos produzidos na vinificação, refletindo um desafio global em termos de gestão de resíduos. Estes subprodutos, contendo leveduras, bactérias e compostos fenólicos, destacam-se não só pelo volume gerado, mas também pelo seu potencial de reaproveitamento, com impactos econômicos e ambientais (De Iseppi *et al.*, 2021).

As borras de vinho são utilizadas para recuperar ácido tartárico, essencial na indústria vinícola para ajustar a acidez dos vinhos (Kontogiannopoulos *et al.*, 2016). Elas também servem como nutrientes em processos fermentativos, enriquecendo o meio e melhorando a qualidade do produto final (De Iseppi *et al.*, 2020). As borras de vinho são ricas em compostos fenólicos, especialmente antocianinas, esse subproduto desperta o interesse da indústria alimentícia, que busca fontes econômicas e abundantes para extrair esses valiosos compostos, que possuem propriedades corantes (Yousuf *et al.*, 2016). Essa característica permite que as antocianinas sejam consideradas alternativas aos corantes artificiais, contribuindo para a criação de produtos alimentícios mais naturais e sustentáveis (Sigurdson; Tang; Giusti, 2017). Além disso, as antocianinas possuem propriedades benéficas à saúde, incluindo potencial antioxidante, ação anti-inflamatória e proteção contra doenças cardiovasculares (Bakuradze *et al.*, 2019, Jamar *et al.*, 2017).

Métodos de extração sustentáveis que minimizam o impacto ambiental, como as técnicas verdes, são prioritários para otimizar a recuperação das antocianinas. Assim, valorizar as borras de vinho não apenas contribui para a sustentabilidade, mas também para a inovação na obtenção de compostos bioativos. No entanto, o uso de solventes para extrair compostos bioativos em um processo convencional, como agitação orbital ou banho termostático, pode ser lento e ainda apresentar baixa eficiência (Halee *et al.*, 2020). Além disso, esses métodos convencionais podem exigir grandes volumes de solvente, o que aumenta os custos operacionais e o impacto ambiental (Álvarez *et al.*, 2017; Romero-Díez *et al.*, 2019). Para aprimorar o rendimento e a eficiência na recuperação de antocianinas, técnicas avançadas como a Extração por Líquido Pressurizado (ELP) são empregadas, utilizando solventes ambientalmente amigáveis, como etanol e água (De Sousa Sabino *et al.*, 2021; Pagano *et al.*, 2021). O ELP permite uma extração mais eficiente, reduzindo o tempo necessário para

solubilizar as antocianinas, minimizando sua degradação térmica. As variações na temperatura ótima para extração, reportadas entre 40 e 100 °C (Pereira *et al.*, 2019; Viganó *et al.*, 2022), indicam a necessidade de otimizar as condições específicas para cada matéria-prima, almejando a máxima eficácia na extração com o mínimo impacto ambiental. Assim, a ELP representa uma abordagem promissora, alinhando eficiência e sustentabilidade no processo de recuperação de antocianinas das borras de vinho.

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar diferentes métodos para a extração das antocianinas presentes na borra do vinho tinto, otimizando as condições para maximizar a recuperação de antocianinas através da extração por líquido pressurizado. Além disso, a bioacessibilidade *in vitro*, a atividade e bioatividade antitumoral dos extratos foram avaliadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 REAGENTES E PADRÕES

Os padrões de compostos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, flavanóis, flavonóis, estilbenos e antocianinas), Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromato-2-ácido carboxílico), reagente Folin-Ciocalteu e 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Os reagentes: ácido cítrico, cloreto de potássio e acetato de sódio foram fornecidos pela Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). As enzimas α -amilase, pepsina, pancreatina e sais biliares (hidrato de taurocolato de sódio, glicooxicolato de sódio e o hidrato de taurodesoxicolato de sódio) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Linhagens celular murina de fibroblastos (L929, Thermo Scientific, Brasil), PBS (PBS, para cultura celular *in vitro*) foram cultivadas em meio de cultura contendo carbonato de sódio (Sigma Aldrich), penicilina-estreptomicina (canetas/estreptococo), meio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM), soro fetal bovino (*fetal bovine serum* - FBS). Enzima TrypLE Express, solução salina tamponada com fosfato (*phosphate buffered saline* - PBS), solução aquosa CellTiter 96® Aqueous One (MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio]) (Promega Biotecnologia do Brasil, Brasil), glutaraldeído e formaldeído. Todos os reagentes utilizados apresentaram grau analítico ($\geq 99,0\%$). A água ultrapura foi obtida de um sistema de água Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, Massachusetts, EUA).

2.2 AMOSTRAS

As amostras de borra foram oriundas do processo de vinificação da uva da variedade Montepulciano (*Vitis vinífera* L.), que foram doadas por uma vinícola localizada em São Joaquim, Santa Catarina.

Para a elaboração dos vinhos, as uvas foram colhidas ao atingir a maturidade tecnológica (23,5°Brix) e encaminhadas para o processo de vinificação. Leveduras selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* (25 g/hL) foram inoculadas para promover a fermentação alcoólica que ocorreu a 20 ± 1 °C por 14 dias, com maceração concomitante. Após esta etapa, ocorreu a prensagem (prensa pneumática com força de 1,4 bar), com a separação das partes sólidas do líquido. O vinho passou por etapa de conversão malolática espontânea, durante aproximadamente 25 dias em temperatura de 13°C. Finalizada a conversão malolática, realizou-se a trasfega e separação das borras (sólidos insolúveis depositados no fundo de tanque), que foram coletadas e armazenadas a -20 °C e transportadas para o laboratório de Bioquímica de Alimentos, no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Santa Catarina para posterior análises. Na sequência, o vinho foi corrigido para 25mg/L de SO₂ livre submetido as etapas de estabilização natural, e posteriormente foi armazenado em barricas de carvalho por 16 meses.

2.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA BORRA *IN NATURA*

A borra de vinho *in natura* foi analisada de acordo com os métodos propostos pela AOAC (2005) e OIV (2016). As borras foram centrifugadas (Modelo K-24, Janetzki®) por 15 minutos a 4000 rpm. A fração líquida foi avaliada quanto ao teor alcoólico (%vol.) por ebulliometria. A fração sólida foi avaliada quanto ao teor de umidade, proteínas, cinzas, acidez total titulável e pH. O teor de umidade (%) foi determinado por secagem em estufa a 105 ± 5 °C. A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Kjeldahl e expressa em g/100g em base úmida. O teor de cinzas foi determinado incinerando a matéria orgânica em mufla a 550 °C e expressa em g/100g em base úmida. A acidez total foi determinada por titulometria, com solução de NaOH 0,1 mol/L e expressa em equivalente de ácido tartárico (g/100g). As determinações de pH foram realizadas por meio de leitura em pHmetro MP 220 (Mettler Toledo, Greifensee, Suíça).

2.4 SECAGEM DA BORRA

O processo de secagem foi realizado em estufa com circulação de ar (Modelo TE-394/2, Tecnal®, Piracicaba, Brasil), e as amostras foram dispostas de maneira uniforme com massa de 150g e fluxo de ar horizontal com velocidade de $0,78 \text{ m.s}^{-1}$. A curva de secagem foi obtida pela pesagem periódica da amostra em balança semi-analítica (Mars-AS2000C, Brasil) em intervalos de 10 minutos, aumentando o intervalo para 30 minutos no final da secagem. A temperatura utilizada no experimento foi de 40°C . Para uniformizar a secagem, as bandejas foram reposicionadas dentro da estufa após cada pesagem.

A umidade em base seca (g de água/ g de sólidos secos) foi calculada a partir dos dados de decaimento da massa em função do tempo (minutos) para elaboração das curvas de cinética de secagem. Foram elaborados gráficos de cinética de secagem no período de taxa constante, sendo considerado o intervalo de tempo desde o início do processo até o tempo que foi possível fazer o ajuste linear que apresente um coeficiente de determinação (R^2) $\geq 0,98$ (Simão et al., 2021). Os valores da taxa de secagem na etapa do período constante foram calculados como a média dos coeficientes angulares obtidos nas equações lineares ajustadas e expressos em g de água/ g de sólidos secos/ min. Sequencialmente, as amostras secas foram moídas em moinho doméstico (PMC01, Philco, China) e o tamanho das partículas foi padronizado por peneiramento (32 *mesh*). As amostras secas foram armazenadas a -18°C para análises futuras.

2.4.1 Modelo matemático

O modelo matemático foi ajustado aos dados experimentais utilizando um modelo semiempírico de Page (1949). O teor de umidade em base seca da amostra foi adimensionalizado, aplicando-se o cálculo de razão de umidade (RU) (Equação 3.1). A cada tempo de secagem, o teor de água foi correlacionado com o teor de água inicial e o teor de água de equilíbrio, para condições específicas de secagem. Desta forma, o modelo semiempírico (Equação 3.2) foram ajustados aos valores de RU em função do tempo de secagem.

$$RU = \frac{X(t) - X_e}{X_0 - X_e} \quad (3.1)$$

Onde $X(t)$ é o teor de umidade no tempo t (umidade/g de matéria seca g), X_e teor de umidade de equilíbrio e X_0 é o teor de umidade inicial (ga / gss) (Midilli, 2001).

$$RU = \exp(-kt^n) \quad (3.2)$$

Onde RU= razão de umidade (adimensional); t= tempo (min.); n = parâmetro dos modelos, k (constante de secagem) k de Page é min-n.

Para avaliar os ajustes dos modelos aos dados experimentais de secagem foi aplicada a análise de regressão não linear. A escolha do melhor ajuste foi pela determinação do maior coeficiente de regressão (R) e menor valor de chi-quadrado (χ^2).

2.5 PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DA BORRA EM PÓ

A capacidade de absorção de água (CAA) e a capacidade de retenção de óleo (CRO) da borra seca foi determinada segundo o método de Glória e Regitano D'arce (2000). As amostras foram homogeneizadas com água destilada em tubo centrífuga e deixadas em repouso por 30 minutos. Após este período foram centrifugadas a 3000 rpm (Modelo K-24, Janetzki®) por 10 min. O mesmo procedimento foi realizado para avaliar a CRO, substituindo a água pelo óleo. Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado e pesado, o mesmo ocorreu com o decantado retido no tubo. Os cálculos foram realizados conforme a **Equação 3.3**, em triplicata. A capacidade de absorção de água e retenção de óleo foi expressa em g de água ou óleo por g de sólidos secos⁻¹.

$$CRA \text{ OU } CRO = \frac{M_d - M_a}{M_a} \quad (3.3)$$

2.6 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO CONVENCIONAL E NÃO CONVENCIONAL DE ANTOCIANINAS DA BORRA EM PÓ

Após o processo de secagem, as amostras de borra em pó foram submetidas a diferentes métodos de extração para recuperar antocianinas. Foram testados quatro métodos para extração de antocianinas: agitador orbital (KMC-1300V®), ultrassom (Ultrasonic cleaner, USC 1400®, 40 kHz), agitação térmica (Ethik, modelo TPA 304, SP, Brasil) e extração por líquido pressurizado (modo estático). Em todos os métodos, foi utilizado como solvente extrator uma solução hidroalcoólica de etanol: solução de ácido cítrico 0,1 mol/L, pH 2,4 (50:50 v/v), a massa

de amostra foi fixa em 4g de borra seca e a relação etanol: solução de ácido cítrico (50:50 v/v) foram mantidos constantes para as extrações.

A extração utilizando agitador orbital foi realizada de acordo com Burin et al. (2014), com modificações. A extração por ultrassom foi realizada em banho de ultrassom, o extrato foi sonificado durante 30 minutos e após o processo o extrato foi filtrado e armazenado em frasco âmbar. O método de extração por agitação térmica foi realizado de acordo com Benvenuti et al. (2020), com modificações, sendo realizada em banho-maria aquecida com agitação intermitente a 55 °C, após o processo o extrato foi filtrado e armazenado em frasco âmbar. A extração por líquido pressurizado ocorreu em um aparelho automontado descrito por Rodrigues et al. (2019). A extração foi realizada conforme Teixeira *et al.* (2021) com modificações em modo estático.

A quantificação das antocianinas monoméricas totais foi realizada pela metodologia descrita por Giusti e Wrolstad (2001). Para isso, foram preparadas as soluções tampões de cloreto de potássio 0,025 M (pH 1,0) e acetato de sódio 0,4 M (pH 4,5). Os extratos foram diluídos em solução tampão de acetato de sódio e cloreto de potássio na proporção 1:10 (v/v). Após determinada a diluição foram feitas as leituras em espectrofotômetro (Hitachi, U-2900, China) nos comprimentos de onda de máxima absorção (520 nm) e a 700 nm. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em mg de equivalentes malvidina-3-glicosídeo (M3G) /g de peso seco.

2.6.1 Delineamento experimental para extração de antocianinas da borra de vinho em pó por líquido pressurizado

O método que apresentou o maior teor de antocianinas, conforme descrito no item anterior (Item 2.6), foi submetido a um planejamento experimental detalhado para otimizar o processo de extração desse composto. A otimização da extração de antocianinas da borra seca foi realizada utilizando um planejamento central composto (CCD). O planejamento foi executado utilizando o método de extração por líquido pressurizado em modo estático. A temperatura de extração (°C) (X_1) e a proporção de solvente (etanol:ácido cítrico, v/v) (X_2) foram as variáveis independentes estudadas em cinco níveis (Tabela 3.1). Os níveis definidos para as variáveis independentes foram baseados em resultados preliminares. O tempo de extração para realização de todos os experimentos do delineamento foi definido por meio de testes preliminares e fixado em 5 minutos.

Tabela 3.1 – Variáveis independentes e seus níveis utilizados para o desenho experimental.

Ensaio	Temperatura (°C)	Etanol: ácido cítrico (v/v)
1	40 (-1)	30:70 (-1)
2	40 (-1)	70:30 (1)
3	70 (1)	30:70 (-1)
4	70 (1)	70:30 (1)
5	34 (-1,41)	50:50 (0)
6	76 (1,41)	50:50 (0)
7	55 (0)	22:78 (-1,41)
8	55 (0)	78:22 (1,41)
9	55 (0)	50:50 (0)
10	55 (0)	50:50 (0)
11	55 (0)	50:50 (0)

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Antocianinas monoméricas totais (AMT) foi a variável dependente utilizada na otimização pela metodologia de superfície de resposta (RSM) acoplada à regressão múltipla.

Primeiramente, a significância estatística dos fatores foi avaliada por ANOVA. Em seguida, os efeitos não significativos ($p > 0,05$) foram removidos e os parâmetros reajustados. A adequação e qualidade de ajuste do modelo foram avaliadas pelo valor p , coeficiente de determinação (R^2) e então R^2 foi ajustado. Em seguida, a condição ótima foi determinada. Os valores experimentais e previstos de cada resposta foram comparados em intervalos de confiança ao nível de 95%.

2.6.2 Determinação de antocianinas monoméricas totais do extrato da borra de vinho

A quantificação das antocianinas monoméricas totais de todos os extratos obtidos através da extração por líquido pressurizado (11 extratos) foi realizada de acordo com o método de pH diferencial (Giusti; Wrolstad, 2001), em espectrofotômetro (Hitachi, U-2900, China), utilizando-se dois sistemas: tampão cloreto de potássio (pH 1,0) e tampão acetato de sódio (pH

4,5). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes malvidina-3-glicosídeo (M3G) /g de peso seco.

Após o processo de planejamento e otimização da extração de antocianinas, o extrato obtido no ponto ótimo do planejamento experimental foi caracterizado em relação a atividade antioxidante, bioacessibilidade e atividade biológica em culturas celulares.

2.6.3 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante *in vitro* foi avaliada utilizando o método de captura de radicais livres de acordo com Re *et al.* (1999), usando o radical ABTS (ácido 2,2-azino- bis (3- etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico) com leitura espectrofotométrica em 754 nm em um espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi U2010, CA, EUA). Os resultados foram expressos em equivalente de Trolox (TEAC) ($\mu\text{mol/L}$).

2.6.4 Simulação gastrointestinal *in vitro*

A simulação gastrointestinal *in vitro* foi realizada conforme descrito por Minekus *et al.* (2014). A digestão *in vitro* consiste de três fases, a fase oral, gástrica e intestinal. A amostra controle foi denominada de controle da borra de vinho e foi utilizada para a digestão *in vitro* sem a presença das enzimas α -amilase, pepsina, pancreatina e sais biliares.

Para a fase oral, amostra, fluido salivar (pH 7,0) e enzima α -amilase (75 U/mL) foram agitados por 2 min a 37 °C. As amostras foram submetidas à fase gástrica para a sequência de digestão. Nesta fase, o fluido gástrico (pH 3,0), pepsina (2000 U/mL) e CaCl_2 (0,075 mol/L) foram adicionados à mistura oral e mantidos em banho termostático por 2 horas a 37 °C. Após a digestão gástrica, as amostras foram submetidas a fase intestinal, onde ocorre a adição do fluido intestinal, pancreatina (800 U/mL), sais biliares (10 mol/L) e CaCl_2 (0,3 mol/L), o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 1 M. A fase intestinal foi incubada durante mais 2 h em banho termostático a 37 °C. No final de cada fase de digestão, o sobrenadante foi recolhido, centrifugado a 2480 g durante 10 min e foi denominado como amostra digerida (fração bioacessível). O pH da fase oral, gástrica e intestinal foi ajustado para 3,0 para permitir a análise cromatográfica. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

2.6.4.1 Bioacessibilidade das antocianinas das frações bioacessíveis

O efeito da digestão *in vitro* sobre a composição das antocianinas da borra de vinho foi avaliado pelo índice de bioacessibilidade, calculado pela **Equação (3.5)** (Ortega et al., 2011).

$$IB (\%) = 100 \cdot A/B \quad (3.5)$$

Sendo A, a concentração de cada composto no final de cada fase da digestão *in vitro* (Granado-Lorencio et al., 2008), B, a concentração de cada composto fenólico antes da digestão *in vitro* da borra de vinho.

2.6.5 Perfil bioativo do extrato da borra de vinho

A determinação da composição bioativa individual foi realizada com o extrato da borra de vinho obtido na otimização por líquido pressurizado. As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu®), composto por uma bomba de alta pressão modelo LC-20AT, desgaseificador modelo DGU-20A5, forno para coluna modelo CTO-20A e injetor manual com loop de 20 µL, controlador de sistema modelo CBM-20A, e software LCsolutions® versão 1.21. As separações dos analitos foram realizadas em coluna de fase reversa C18 (modelo Shim-pack Shimadzu®) (4,6 mm x 250 mm, 5µm de tamanho de partícula). A detecção dos compostos foi realizada através do detector de arranjo de fotodiodos (DAD) (modelo SPDM20A; Shimadzu®).

A identificação e quantificação dos polifenóis individuais e antocianinas individuais foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos respectivos padrões e através de curva de calibração por padronização externa. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.6.5.1 Polifenóis individuais

Para a determinação dos compostos fenólicos individuais, as amostras foram diluídas, sendo 1 mL de amostra para 5 mL de água:ácido acético (98:2 v/v). Para injeção no sistema cromatográfico as amostras foram filtradas em membrana PTFE de 0,22 µm.

Os ácidos hidroxibenzóicos (ácidos gálico, protocateico, vanílico, siríngico e elágico) e os demais compostos fenólicos (tirosol, catequina, epicatequina, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido trans-caftárico, campferol, miricetina, quercetina e *trans*-resveratrol) foram determinados utilizando o método descrito por Burin *et al.* (2014). Como solvente para fase móvel A utilizou-se água:ácido acético (98:2 v/v) e para a fase móvel B água:ácido

acético:acetonitrila (58:2:40 v/v/v). As condições do gradiente de eluição são: 0-80 % solvente B por 55 minutos, de 80-100 % de B por 15 minutos, retornando em 0 % de solvente B durante 5 minutos. O fluxo utilizado foi de 0,90 mL/min. Para a quantificação dos ácidos hidroxibenzóicos, tirosol, catequina e epicatequina utiliza-se comprimento de onda em 280 nm, para os ácidos hidroxicinâmicos (cafeico, caftarico, p-cumárico e ferúlico) a quantificação ocorre em 320 nm, os flavonóis (miricetina, quercetina e campferol) são quantificados em 360 nm e o *trans*-resveratrol em 306 nm. Os resultados foram expressos em mg/g (base seca).

2.6.5.2 Antocianinas individuais

Para a determinação das antocianinas individuais, as amostras foram diluídas, sendo 1 mL de amostra para 25 mL de água: ácido fórmico (90:10 v/v). As antocianinas monoglicosídeos (malvidina, cianidina, delphinidina e peonidina-3 glicosídeos) foram determinadas de acordo com o método descrito por Revilla *et al.* (1999). A fase móvel A foi constituída de água: ácido fórmico (90:10 v/v) e fase móvel B de água: metanol: ácido fórmico (45:45:10 v/v/v). O modo de eluição em gradiente foi realizado a uma concentração de solvente B de 35-95% durante 20 minutos, de 95- 100% por 5 minutos, mantendo a concentração de 100% por mais 5 minutos, a uma taxa de fluxo de 0,8 mL/min. A detecção dos compostos foi determinada no comprimento de onda de 520 nm. Os resultados foram expressos em mg/g (base seca).

2.6.6 Ensaio de atividade biológica do extrato da borra de vinho

Linhagens de fibroblastos murinos (L929, Thermo Scientific, Brasil), solução salina tamponada com fosfato para cultura celular *in vitro* (PBS do inglês *phosphate buffered saline*) foram cultivadas em meio de cultura contendo carbonato de sódio (Sigma Aldrich), penicilina-estreptomicina (canetas/estreptococo), meio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM), soro fetal bovino (FBS). Enzima TrypLE Express, solução salina tamponada com fosfato (PBS), solução aquosa CellTiter 96® Aqueous One (MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio]) (Promega Biotecnologia do Brasil, Brasil), glutaraldeído e formaldeído também foram utilizados. As amostras foram ressuspensas em meio DMEM, filtradas (0,22 µm) e diluídas em diferentes concentrações (0-1000 µg/mL). Para assegurar a precisão e a confiabilidade dos resultados na avaliação da toxicidade, cada concentração foi

testada em quatro réplicas independentes. Para o ensaio de contato direto, as diferentes concentrações foram aplicadas diretamente sobre as células.

2.6.6.1 Cultura celular

As linhagens celulares foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) e complementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em ambiente umidificado a 37 °C com 5% de CO₂. O meio de cultura celular foi renovado a cada 48 horas até que as células atingissem um nível de confluência de 75-90%. Posteriormente, as células foram dissociadas usando Tryplex, contadas e semeadas.

2.6.6.2 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada medindo-se a atividade metabólica de células fibroblásticas normais (L929) por ensaio colorimétrico MTS por contato direto (ISO 10993-5:2009). As células foram colocadas a uma densidade de $5 \cdot 10^3$ células/poço e cultivadas por 24 h em placas de 96 poços. Após a adesão completa, os extratos foram adicionados (0-1000 µg/mL) e incubados por 24 h. A densidade óptica (DO) foi medida por espectrofotometria (490 nm, Molecular Devices), e os poços controle continham apenas meio de cultura. A viabilidade celular (%) foi determinada quanto ao arranjo de controle em 100% (Melgar et al., 2021).

2.6.6.3 Estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio em células

Para avaliação da viabilidade celular após estresse oxidativo (H₂O₂), células de fibroblastos L929 foram semeadas a uma densidade de $5 \cdot 10^3$ células/poço em uma placa de 96 poços contendo meio de cultura DMEM suplementado com 10% FBS e incubado durante a noite a 37 °C em uma atmosfera umidificada de 5% de CO₂. Após a incubação, DMEM com FBS a 10% contendo 500 µg/mL de extratos foi utilizado para tratar células expostas concomitantemente a 1,0 mM de H₂O₂ por 24 h (Pitz *et al.*, 2016). A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT (Leonarski *et al.*, 2023).

2.6.6.4 Atividade antitumoral

A atividade antitumoral foi avaliada em células de glioma de camundongo (GL261 e C6) e adenocarcinoma de pulmão (A549). A viabilidade celular foi medida usando ensaio colorimétrico MTS. As células glioma de camundongo (GL261 e C6) e adenocarcinoma de pulmão (A549) foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de $1 \cdot 10^4$ células/poço por 24 h a 37 °C em uma incubadora de CO₂ para fixação. Após 24 h, as células foram tratadas com 500 µg/mL de extrato. A doxorrubicina (10 µg/mL) foi utilizada como controle positivo, e o controle branco utilizou apenas o meio de cultura. As células tratadas foram incubadas por 24, 48 e 72 h a 37 °C em estufa de CO₂. Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Uma mistura de 100 µL de meio e 20 µL de reagente MTS foi adicionada a cada poço e mantida por 2 h em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C. A solução foi transferida para placas de 96 poços para medição da densidade óptica (DO) no comprimento de onda de 490 nm em espectrofotômetro (*Molecular Devices*) (De Sousa *et al.*, 2020).

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A atividade metabólica das células foi analisada usando o OriginPro® (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, EUA) expressa como a média ± erro padrão de três ensaios independentes e suas triplicatas. A análise dos demais dados foi realizada utilizando-se o software STATISTICA 13.5 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, EUA). Para determinar as diferenças significativas ($p < 0,05$), foi realizada a análise de variância *one-way* (ANOVA). Os resultados serão expressos como valores médios ± desvio padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BORRA DE VINHO *IN NATURA*

Os resultados referentes às análises físico-químicas da borra de vinho tinto *in natura* estão apresentados na Tabela 3.2. Os valores de pH para borras de vinho tinto encontrados na literatura variam, Bustamante *et al.* (2008) reportou um pH médio de 4,00 e Kontogiannopoulos *et al.* (2016) um pH de 3,57, enquanto neste estudo observou-se um pH de 3,92. Essa faixa indica a natureza ácida das borras de vinho, o que pode ser benéfico para certas aplicações, como o desenvolvimento de produtos alimentícios, especialmente para produtos lácteos como

iogurtes e bebidas lácteas, que possuem uma faixa de pH semelhante (Mehra et al., 2022). O teor alcoólico determinado na fração líquida da borra de vinho (após centrifugação) foi de 13,57 %. O teor de proteína da borra de vinho foi 7,95 g/100g, o valor considerável em relação a outros subprodutos agroindustrial (Rachwał et al., 2020; Carranza-Méndez et al., 2022) provavelmente foi causado pelos resíduos gerados pela autólise das células de levedura. O teor de cinzas foi de 3,27 g/100g. Em estudo conduzido por De Andrade Bulos et al. (2023), a composição de proteínas e cinzas de borras de vinho a partir de diferentes estudos científicos foi relatada. O teor de proteínas nos diferentes estudos variou de 9,5 a 21,20 g/100g e o teor de cinzas variou de 6,10 a 14,00 g/100g, esses valores são próximos aos valores encontrados nesse estudo.

Tabela 3.2 - Composição química da borra de vinho tinto in natura.

Parâmetro	Resultados
Umidade (g/100g)	73,83 ± 0,25
pH	3,92 ± 0,02
Acidez total titulável (g de ácido tartárico/100 g de amostra)	4,21 ± 0,05
Teor alcoólico (% volume) *	13,57 ± 0,06
Cinzas (g/100g)	3,27 ± 0,27
Proteína (g/100g)	7,95 ± 3,51

Resultados dos valores médios ± desvio padrão (n=3).

Fração líquida da borra de vinho.*

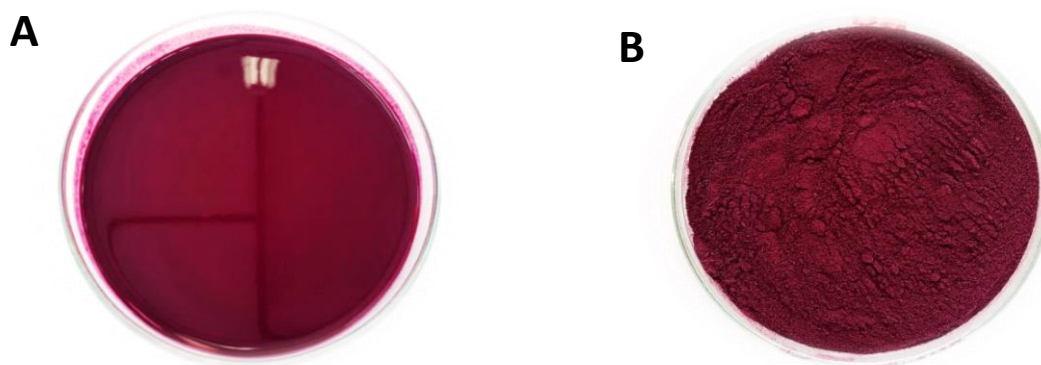
A complexidade da composição das borras de vinho é amplamente influenciada por uma variedade de fatores, que vão desde a especificidade da variedade de uva até as características únicas do *terroir* onde as uvas são cultivadas, além de outros fatores bióticos e abióticos (Pérez-Bibbins *et al.*, 2015). É importante destacar que essa complexidade também pode estar relacionada aos microrganismos presentes, especialmente as leveduras, que após a fermentação alcoólica, passam por um processo de autólise liberando compostos intracelulares juntamente com os resíduos orgânicos e inorgânicos das borras oriundos dos processos de vinificação, como restos de uva, nutrientes e sais minerais (Antón-Díaz *et al.*, 2016).

A caracterização química da borra de vinho *in natura* revelou um teor proteico significativo e um pH ácido, destacando seu potencial como subproduto agroindustrial valioso. No entanto, estudos sobre parâmetros de secagem são cruciais para valorizar esses subprodutos, proporcionando um entendimento mais profundo de sua composição e facilitando a aplicação em outros produtos. Isso não apenas aumenta o valor agregado das borras de vinho, mas também promove a sustentabilidade ao reduzir o desperdício ao explorar seu potencial como um ingrediente para aplicações industriais.

3.2 CURVA CINÉTICA E TAXAS DE SECAGEM DA BORRA DO VINHO

A curva de secagem permitiu avaliar o comportamento da borra de vinho ao longo do processo de secagem até que a massa do material permaneça constante. No início do processo de secagem a água do material é removida de forma constante, essa etapa é denominada como período de taxa constante de secagem, onde a água livre é removida e o sistema se comporta como se não houvesse a presença do material sólido. A etapa continua enquanto a superfície do material se mantiver úmida com migração da água da matriz para o ar de secagem sem resistência. Depois desse período, o material alcança a umidade crítica, que marca o fim da fase de taxa constante e o início da fase de taxa decrescente de secagem (Berk, 2018). No período de taxa decrescente, a água continua a ser removida, mas o processo acontece de maneira mais lenta, pois a água precisa difundir a matriz do interior do alimento até atingir a superfície. Assim que a água atinge a superfície, ela é removida pelo fluxo de ar que apresenta uma menor pressão de vapor, criando um gradiente que estabelece o fluxo de massa. O processo de secagem pode ser interrompido quando a temperatura da superfície do material atingir o ponto de bulbo seco e a massa do material permanecer constante (Berk, 2018; Fellows, 2018). A Figura 3.1A representa a amostra de borra de vinho *in natura* antes do processo de secagem e a Figura 3.1B representa a amostra de borro de vinho após o processo de secagem.

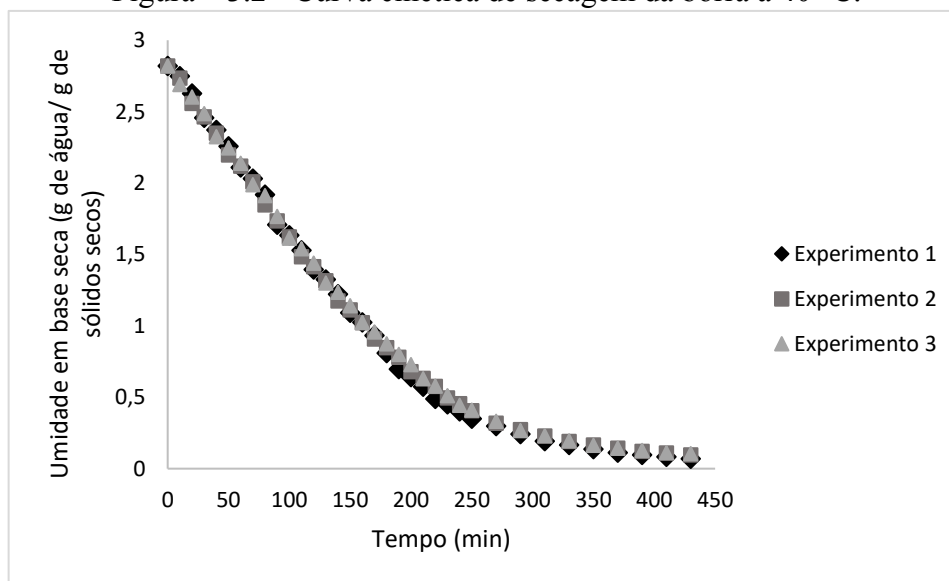
Figura 3.1 – Amostras de borra de vinho antes (A) e após (B) o processo de secagem.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Na Figura 3.2 é apresentada a curva cinética de secagem da borra de vinho. A curva cinética de secagem foi gerada pela umidade em base seca (g de água por g de sólidos secos) em função do tempo (em minutos).

Figura 3.2 - Curva cinética de secagem da borra a 40 °C.



Onde, Experimento 1, 2 e 3: replicatas dos dados da curva cinética de secagem.

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

É possível observar um decaimento progressivo da umidade representado pelo período de taxa constante, até atingirem valores assintóticos, ou seja, valores que se aproximam gradualmente, caracterizado pelo fim do período de taxa decrescente. A cinética de secagem é influenciada diretamente pela temperatura, e ao utilizar temperaturas menos elevadas ocorre o acréscimo do tempo de secagem (Geankoplis, 1993). O tempo de secagem da borra de vinho foi de 420 minutos. Inicialmente, a umidade da amostra da borra de vinho era de $73,83 \pm 0,20\%$

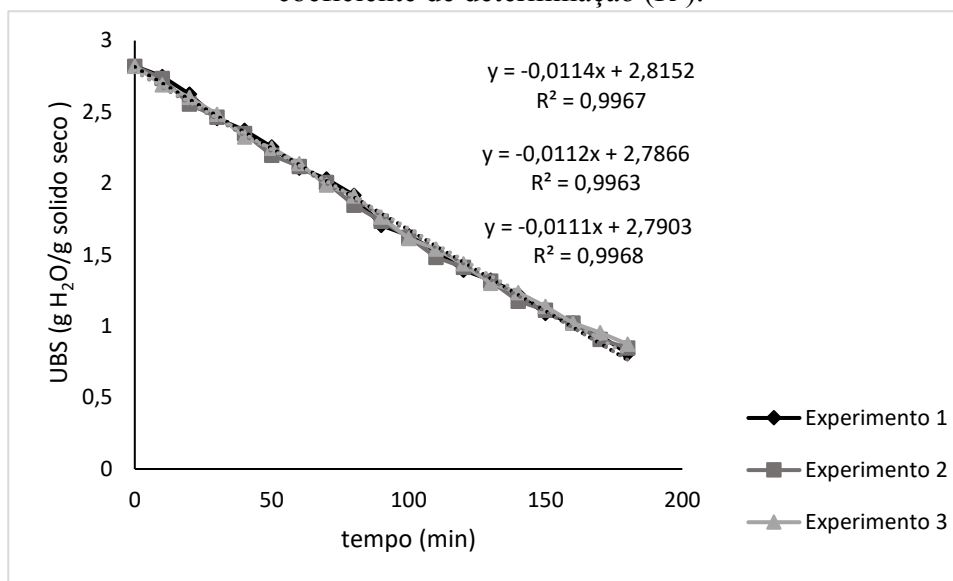
(2,821 g de água / g de sólidos secos) e atingiu a umidade final de $8,32 \pm 1,62 \%$ ($0,091 \pm 0,019$ g de água / g de sólidos secos). Portanto, a amostra apresentou remoção de água de 88%.

Estudo realizado por Haas *et al.* (2017) com resíduos do processamento de suco de uva convencional e orgânica observou-se que a cinética de secagem foi avaliada em diferentes temperaturas, 45, 55 e 65 °C. Os autores observaram que ao utilizar a temperatura de 45 °C o tempo de secagem foi maior que ao utilizar temperaturas mais elevadas. Além disso, a redução de umidade do resíduo foi mais acentuada a 65 °C, quando comparada com a secagem realizada em 45 e 55 °C, uma vez que a velocidade de secagem é maior com o aumento da temperatura. Este aumento na velocidade de secagem ocorre devido um o aumento do potencial de transferência de calor entre o ar circulante e a amostra, o que favoreceu a difusão da água.

É importante ressaltar que embora a eliminação de água obtida durante o processo de secagem melhora a estabilidade do produto durante o armazenamento, a temperatura que o alimento é exposto durante um determinado tempo pode modificar seu potencial bioativo. Estudos demonstram que a utilização de temperaturas elevadas na secagem de subprodutos oriundos do processamento da uva pode resultar em degradação significativa de compostos fenólicos como as antocianinas, além de impactar negativamente na capacidade antioxidante (Goula *et al.*, 2016; Haas *et al.*, 2017).

A Figura 3.3 apresenta as taxas de secagem e umidade crítica para a borra de vinho durante o processo de secagem. As taxas de secagem no período constante foram obtidas através da determinação do coeficiente angular das equações lineares ajustadas e também através deste ajuste linear foi possível determinar a umidade crítica da amostra e foram representadas por três repetições denominadas de experimento 1, 2 e 3.

Figura 3.3 - Taxa de secagem da borra à 40 °C. Obtenção das equações da reta e do coeficiente de determinação (R^2).



Onde, Experimento 1, 2 e 3: replicatas dos dados para taxa de secagem.

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

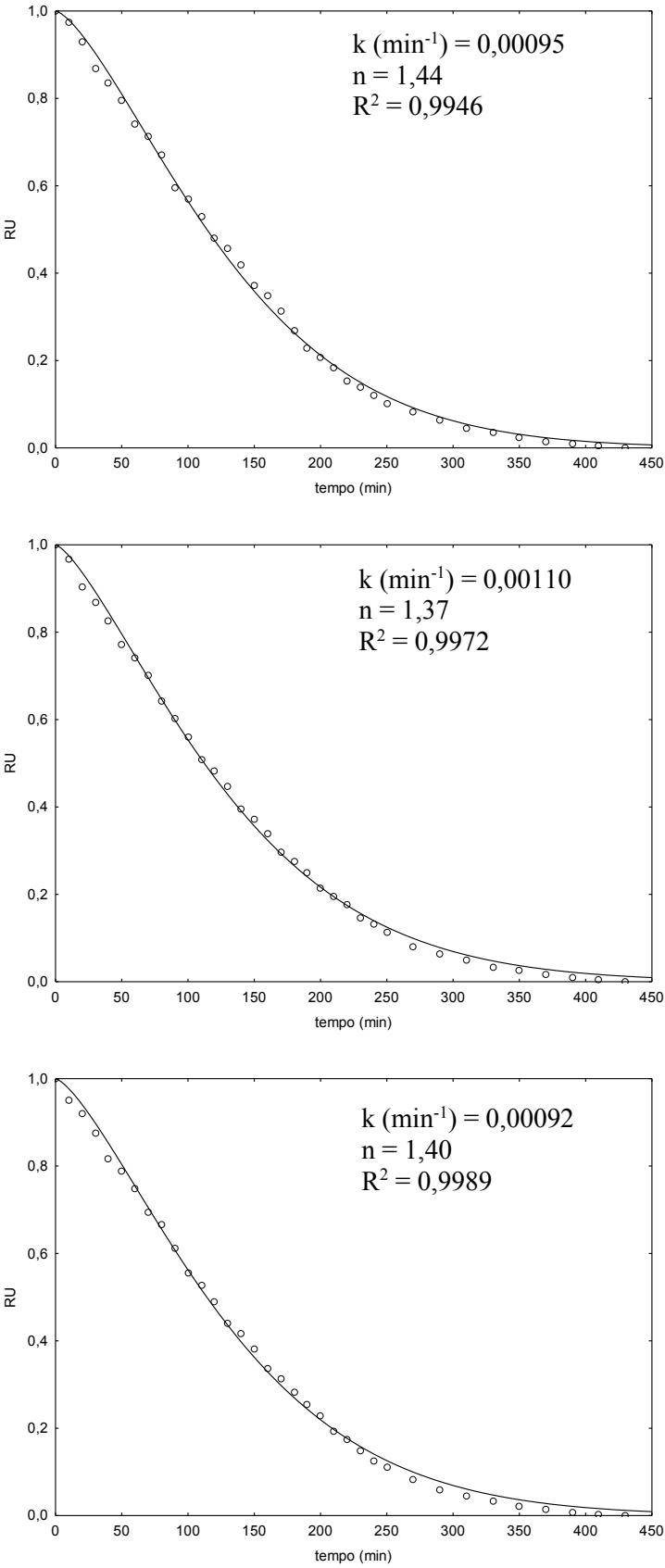
Os valores médios da umidade crítica da borra de vinho foram de $0,84 \pm 0,03$ e g de água/ g de sólidos secos. O tempo em que esta condição de umidade foi atingida foi de 180 minutos. Quando a amostra atingiu a umidade crítica em 180 minutos, o teor médio de umidade removido foi de 44 %. Em relação à taxa de secagem, foi obtido o valor médio de $0,0112 \pm 0,001$ g de água/ g de sólido secos.min.

De acordo com a Instrução Normativa nº 22/2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o teor máximo de umidade permitido para farinhas é de 15% (BRASIL, 2005). De acordo com a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) e a World Health Organization (WHO) o teor de umidade máximo para farinhas é estabelecido em 14,5%. Esse limite ajuda a garantir a qualidade e a segurança alimentar das farinhas, pois um teor de umidade mais elevado pode favorecer a proliferação de micro-organismos e afetar a qualidade dos produtos. Assim, considerando as legislações nacionais e internacionais que estabelecem critérios semelhantes para farinhas, o tempo de secagem para atingir a umidade desejada para borra (15 %) seria de 330 minutos a 40 °C. Tendo em vista que o período posterior a umidade crítica se refere ao período de taxa decrescente, após a umidade crítica ser atingida em 180 min, a amostra ainda permaneceria por mais 150 minutos no período de taxa decrescente e após este tempo, o processo de secagem poderia ser interrompido.

3.2.1 Modelagem matemática

Na literatura, diversos modelos matemáticos têm sido propostos para descrever a perda de umidade e a cinética de aumento da temperatura durante o processo de secagem. Estes modelos visam obter parâmetros ideais para a secagem, auxiliam na definição do projeto de um equipamento e a compreender e quantificar a ocorrência de transferência de massa no interior do produto durante o processo de secagem (Ratti, 2008). O modelo matemático de Page foi selecionado para ser ajustado aos dados das curvas cinéticas de secagem das amostras de borra de vinho apresentados na Figura 3.4. As curvas cinéticas foram elaboradas a partir dos dados adimensionais de Razão de Umidade (RU), que foram determinados utilizando os dados experimentais do teor de umidade e foram gerados em função do tempo (minutos).

Figura 3.4 - Replicatas das curvas cinéticas de secagem ajustadas ao modelo matemático de Page.

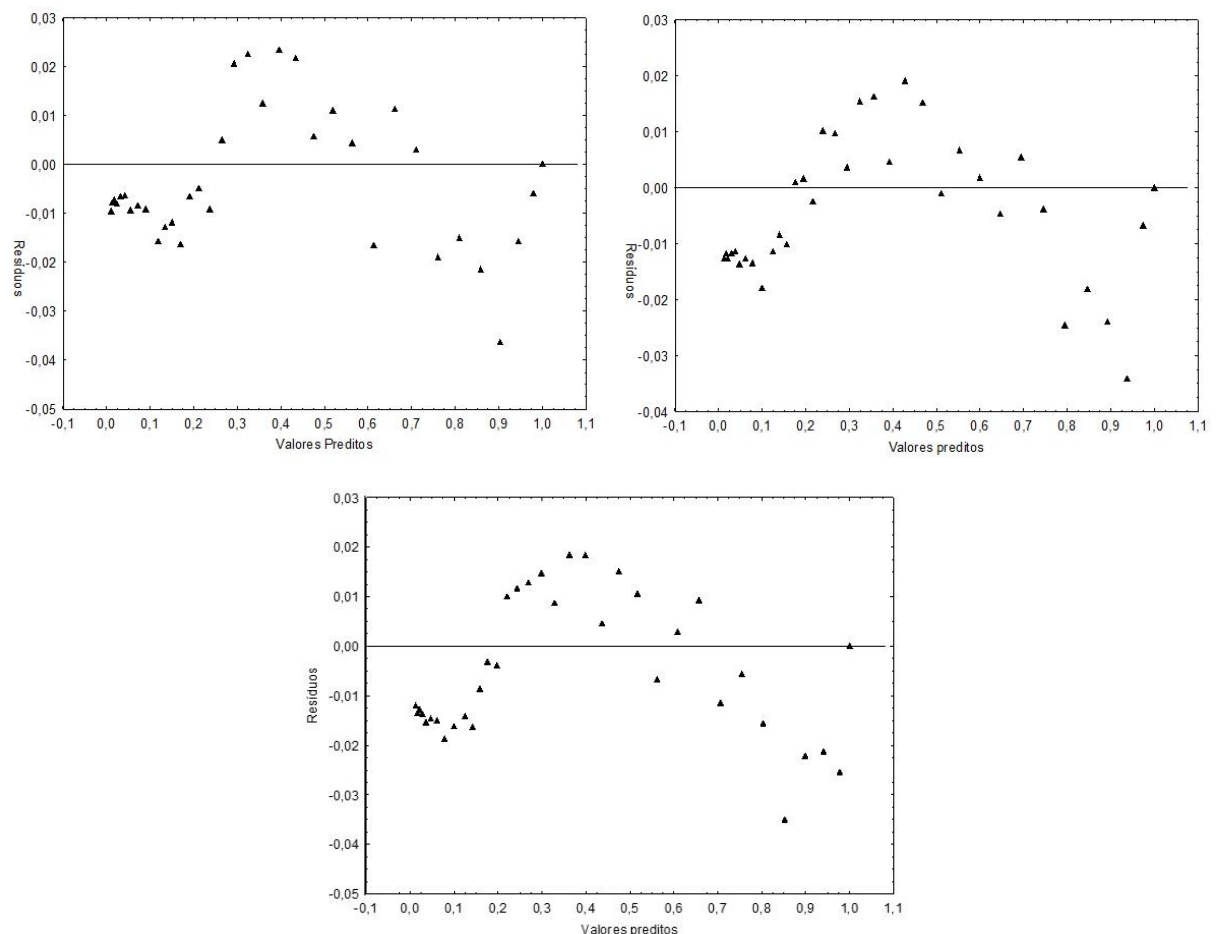


Fonte: Elaborado pela autora (2024).

O modelo de Page se ajustou satisfatoriamente aos dados experimentais do processo de secagem, apresentando R^2 superiores a 0,994. Os valores de R^2 encontrados para o modelo de Page indicam bons ajustes do modelo aos dados experimentais. Os parâmetros dos modelos k e n são apresentados e foram semelhantes a literatura (Toğrul, 2010; Onwude *et al.*, 2016).

Na análise dos gráficos dos resíduos (Figura 3.5), o mesmo comportamento foi observado para a triplicata das amostras. Analisando estes gráficos, observa-se que os pontos estão próximos da linha central do zero distantes da linha central do zero, caracterizando um ajuste matemático satisfatório o que é corroborado pelos valores de R^2 . Além disso o modelo de Page, apresentou valores superestimado no início e no final do processo, indicando que este modelo é adequado, porém comportamento sugere a necessidade de ajustes ou considerações adicionais para melhorar a precisão do modelo nesses intervalos.

Figura13.5 - Replicatas dos resíduos do modelo de Page.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

O modelo de Page também foi utilizado por outros pesquisadores para descrever os comportamentos de secagem de bagaço de uva ($R^2 > 0,997$) (Goula *et al.*, 2016), resíduo do processamento do suco de uva ($R^2 > 0,997$) (Haas *et al.*, 2016) e polpa de pitaya vermelha (*Stenocereus queretaroensis*) ($R^2 > 0,995$) (Mahayothee *et al.*, 2018; Rios-Moreno *et al.*, 2022). O estudo dos parâmetros do processo e o conhecimento da cinética de transferência de massa são importantes para compreender e prever o comportamento de secagem dos subprodutos vinícolas sob diversas condições de secagem. A modelagem de processos ajuda a compreender melhor um fenômeno para melhorias adicionais e aplicabilidade mais ampla (Cosme-De Vera *et al.*, 2021).

3.3 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DA BORRA DE VINHO EM PÓ

A borra em pó obtida do processo de secagem apresentou teor de cinzas de 13,36 g/100g e o teor de proteínas de 19,16 g/100g (Tabela 3.3). Esses resultados estão de acordo com resultados obtidos para farinhas elaboradas com borra de vinho tinto (Rivas *et al.*, 2021; Caponio *et al.*, 2024). A utilização de borras de vinhos na produção de novos produtos, como biscoitos enriquecidos, tem mostrado resultados promissores em termos de composição nutricional (Caponio *et al.*, 2024). A adição de borras de vinho tem demonstrado aumentar o teor de proteína nos produtos, como evidenciado por Sharma e Aglawe (2022) em iogurtes e por Delgado *et al.* (2015) em biscoitos enriquecidos. O alto teor de cinzas encontrado nas borras de vinho pode ser considerada uma fonte de micronutrientes essenciais, a adição de borras de vinho em produtos alimentícios, como biscoitos resultou em um aumento significativo na concentração de cinzas nos biscoitos adicionados com subproduto da vinificação (Maner *et al.*, 2017; Sancho-Galan *et al.*, 2020). Esses resultados indicam o potencial das borras de vinho na valorização de resíduos e no desenvolvimento de produtos alimentícios mais nutritivos e funcionais.

Tabela 3.3 - Composição química e propriedades tecnológicas da borra de vinho tinto obtidas por secagem em estufa.

Parâmetro	Resultados
Cinzas (g/100g)	13,36 ± 0,16
Proteínas (g/100g)	19,16 ± 0,34
Capacidade de retenção de água (g de água/ g de sólidos secos)	2,03 ± 0,04
Capacidade de retenção de óleo (g de óleo/ g de sólidos secos)	2,33 ± 0,03
Índice de solubilidade em água (%)	11,59 ± 0,09

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Com relação as propriedades tecnológicas, a capacidade de retenção de água foi de 2,03 g de água/ g de sólidos secos e a capacidade de retenção de óleo foi de 2,33 g de óleo/ g de sólidos secos. Os subprodutos da vinificação, como cascas, caules e borras, mostraram capacidades de retenção de água e óleo variando de 4,57 a 9,11 g de água/ g e de 3,76 a 5,48 g de óleo/ g, respectivamente, com as borras apresentando os maiores valores para ambos (Rivas *et al.*, 2021). Essas medidas sugerem que eles têm potencial para uso em alimentos que se beneficiam da retenção de umidade e gordura, oferecendo propriedades tecnológicas importantes para a indústria alimentícia.

Marcos *et al.* (2023) utilizaram a farinha de bagaço de uva para melhorar as propriedades nutricionais e sensoriais de crackers salgados. O estudo analisou os efeitos da incorporação de diferentes níveis de farinha de bagaço de uva (5%, 10% e 15% (w/w)) e encontrou que esses produtos apresentavam cores distintas e atraentes, além de serem considerados "ricos em fibras" quando incorporados com 10% de farinha de bagaço de uva, sugerindo um alimento funcional. Este estudo destaca o potencial da utilização de subprodutos da vinificação como um ingrediente inovador na produção de alimentos funcionais

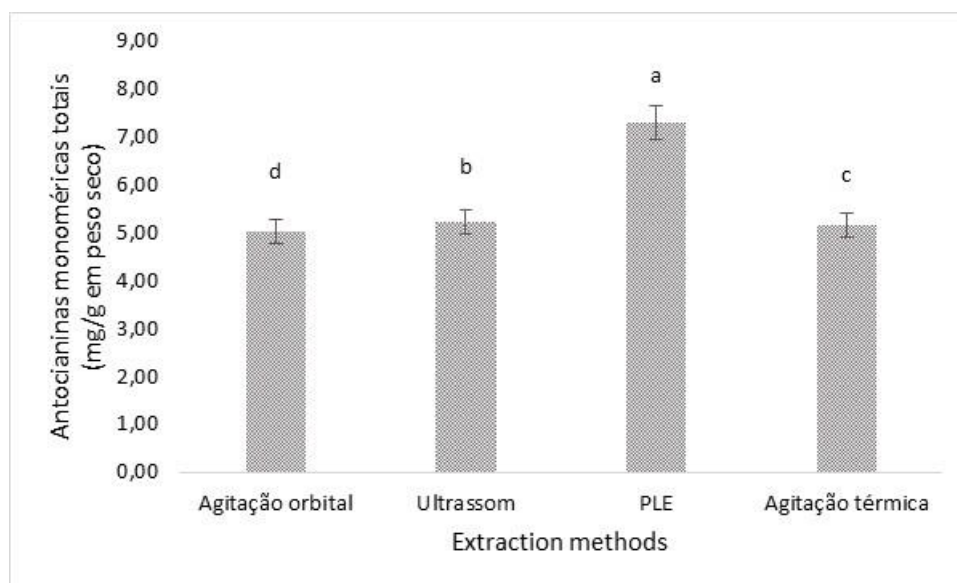
Além das propriedades tecnológicas discutidas, as borras de vinho apresentam uma composição química rica que merece atenção. A exploração desses compostos, especialmente através de tecnologias verdes de extração, é crucial para a valorização dos subprodutos. O estudo recente realizado por Garcia-Castello, Conidi e Cassano (2024), destaca a extração de compostos bioativos como um exemplo de aproveitamento eficaz, evidenciando a importância

de desenvolver processos sustentáveis que maximizem o potencial desses subprodutos na indústria.

3.4 EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS DA BORRA DE VINHO EM PÓ

Diferentes métodos de extração foram avaliados quanto ao teor de antocianinas monoméricas totais dos extratos da borra utilizando a análise de variância (ANOVA). É possível observar na Figura 3.6 que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os métodos de extração aplicados, sendo que a extração por líquido pressurizado (EPL) realizada no modo estático apresentou os maiores valores de antocianinas totais, seguida da extração por ultrassom, agitação térmica e agitação orbital.

Figura 3.6 - Extração de antocianinas monoméricas totais utilizando diferentes métodos de extração: agitador orbital, ultrassom, extração por líquido pressurizado (ELP) modo estático e agitador térmico.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Neste trabalho foi avaliado a configuração de operação em modo estático na extração por líquido pressurizado. Na configuração estática, o processo de extração consiste em um ou vários ciclos de extração, onde o solvente preenche o extrator, enquanto que a válvula de saída da célula de extração é mantida fechada, permanecendo em contato com a matriz durante um tempo determinado. A extração estática permite maior penetração do solvente nos nano e micro poros da matriz devido ao maior tempo de contato entre as fases (Nieto *et al.*, 2010).

O método de extração por líquido pressurizado permite uma extração rápida e também promove uma redução do consumo do solvente, por ser um sistema fechado, não há exposição dos extratos à luz, oxigênio e calor excessivo, trata-se de uma técnica distinta com baixo impacto ambiental, superando as desvantagens dos métodos convencionais (Osorio-Tobón; Meireles, 2013). Portanto, a extração por líquido pressurizado apresenta como principal vantagem em relação aos outros métodos de extração, a possibilidade de realizar a extração em temperaturas mais elevadas, com maior seletividade. Essas condições melhoram a solubilidade e a dessorção do soluto da matriz sólida (Mustafa; Turner, 2011), o que acarreta em aumento do teor de compostos no extrato. Além disso, é importante ressaltar que o ELP atende ao conceito de química verde, que visa aplicar processos de extração rápida, com pequenas quantidades de solvente e operações unitárias reduzidas, uma vez que o método não requer etapas de centrifugação e filtração após a extração (Lasta *et al.*, 2019).

Estudo realizado por Pereira *et al.* (2019) avaliou o método de ELP para obtenção de extratos ricos em antocianinas e polifenóis do bagaço de uva. Os resultados demonstraram que essa tecnologia apresenta grande potencial para a recuperação de compostos bioativos, uma vez que os extratos apresentaram alto rendimento de antocianinas e polifenóis. Além disso, os autores observaram que o tipo de solvente e a temperatura influenciaram significativamente ($p < 0,05$) na recuperação dos compostos, onde para as antocianinas, a melhor condição foi etanol-água pH 2,0 (50% p/p) a 40 °C. Quinze antocianinas foram identificadas e quantificadas nos extratos no bagaço de uva por UHPLC, sendo que as antocianinas malvidina-3-O-glicosídeo, petunidina-3-O-glicosídeo, malvidina-3-O-(6"-trans-p-cumaroil)-glicosídeo, peonidina-3-O-glicosídeo e delfinidina-3-O-glicosídeo representaram mais de 78% dos pigmentos da amostra.

Com base nos resultados, ELP em modo estático foi selecionado como o melhor método de extração para antocianinas monoméricas totais da borra do vinho. É importante salientar que as condições ótimas de extração por ELP em modo estático, foram avaliadas utilizando um planejamento central composto, conforme descrito no item 3.5.

3.5 OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS DE BORRA DE VINHO POR LÍQUIDO PRESSURIZADO

Para otimizar a eficiência da extração por líquido pressurizado, foi realizado um planejamento experimental nas borras de vinho tinto. Os resultados apresentados na Tabela 3.4 evidenciaram diferenças significativas na concentração de antocianinas monoméricas totais

(AMT), demonstrando que as condições experimentais, como a temperatura e concentração de solvente (etanol: água acidificada com ácido cítrico), desempenharam um papel crucial na eficiência da extração.

Tabela 3.4 - Teor de antocianinas monoméricas totais, nos onze ensaios de extração por líquido pressurizado (ELP).

Ensaio	Temperatura (°C)	Etanol: ácido cítrico (v/v)	AMT (mg/g)
1	40,00	30:70	4,56 ^h
2	40,00	70:30	5,62 ^e
3	70,00	30:70	4,31 ^j
4	70,00	70:30	5,43 ^f
5	33,79	50:50	5,24 ^g
6	76,21	50:50	5,64 ^e
7	55,00	22:78	4,45 ⁱ
8	55,00	78:22	6,00 ^d
9	55,00	50:50	6,20 ^b
10	55,00	50:50	6,43 ^a
11	55,00	50:50	6,07 ^c

Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão. AMT: antocianinas monoméricas totais. Letras diferentes na mesma coluna indica diferença significativa entre os experimentos ($p < 0,05$).

Fonte: A autora (2024).

O teor de antocianinas totais da borra de vinho variou significativamente ($p < 0,05$) de 4,31 (ensaio 3) à 6,43 mg M3G/g (ensaio 10). A maior concentração foi obtida no ensaio 9 com condição de temperatura de 55 °C e proporção etanol: ácido cítrico 50:50 (v/v), enquanto a concentração mais baixa foi registrada quando o ensaio foi conduzido e com temperatura de 70 °C e proporção de etanol de 30% no solvente (ensaio 3).

A significância dos fatores foi confirmada pela análise de variância (ANOVA) (Tabela 3.5). O modelo proposto foi significativo ($p < 0,001$) e não apresentou falta de ajuste (p falta de ajuste = 0,22). O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,91 e o R^2 ajustado $> 0,88$. O alto coeficiente de determinação (R^2), indica uma forte relação entre as variáveis independentes e dependentes no modelo estatístico empregado, sugerindo uma excelente capacidade do modelo em explicar a variabilidade dos dados.

Tabela 3.5 - Análise de variância da extração de antocianinas totais de borra de vinho.

	SS	DF	QM	F-valor	p-valor
Temperatura (°C) (L)	0,001665	1	0,001665	0,04846	0,846190
Temperatura (°C) (Q)	1,323745	1	1,323745	38,52509	0,024988
Concentração de solvente (%) (L)	2,418992	1	2,418992	70,40019	0,013909
Concentração de Solvente (Q)	1,970539	1	1,970539	57,34883	0,016994
Falta de ajuste	0,377036	3	0,125679	3,65764	0,222095
Erro puro	0,068721	2	0,034361		
Total SQ	5,433542	10			

DF, graus de liberdade; QM, quadrado médio; L, efeito linear; Q, efeito quadrático. A linha em negrito apresenta diferença significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

As variáveis independentes que foram significativas ($p < 0,01$), representadas por seus coeficientes lineares e quadráticos são apresentadas na Tabela 3.6.

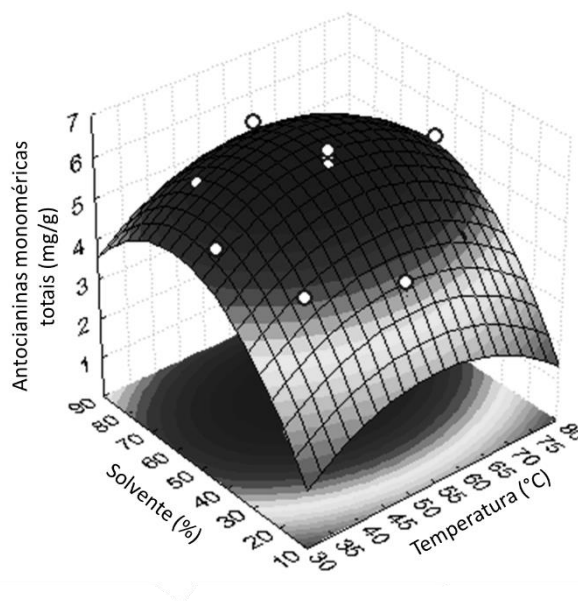
Tabela 3.6 - Efeitos das variáveis independentes proporção de solvente e temperatura sobre o teor de antocianinas monoméricas totais do extrato da borra do vinho.

Fatores	Coef. de Regressão	Erro Padrão	t-valor	p-valor	-95% de confiança	+95% de confiança
Constante	6,23333	0,10525	59,2235	<0,0002	5,78047	6,686192
X₁	0,03142	0,12891	0,24375	0,830144	-0,52321	0,586058
X₁²	-0,96958	0,153428	-6,31945	0,024137	-1,62973	-0,309434
X₂	1,09301	0,128906	8,47913	0,013625	0,53837	1,647644
X₂²	-1,18458	0,153428	-7,72076	0,016365	-1,84473	-0,524434

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Foi gerado gráfico de superfície de resposta 3D a partir dos modelos de regressão múltipla, com o intuito de elucidar os efeitos das variáveis independentes, como ilustrado na Figura 3.7.

Figura 3.7 - Gráfico de superfície de resposta para avaliar o efeito da temperatura e concentração de solvente na extração total de antocianinas da borra de vinho.



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

Com base no modelo proposto, o efeito linear da temperatura (X_1) não foi significativo ($p < 0,05$) no teor de antocianinas, enquanto o efeito linear positivo da concentração de etanol no solvente (X_2) influenciou significativamente no aumento da concentração de antocianinas no extrato. O efeito quadrático negativo da temperatura (X_1) e da concentração de etanol no solvente indicam que, embora o aumento da temperatura e da concentração de etanol inicialmente possa aumentar a taxa de extração de antocianinas, há um ponto crítico em que a eficiência da extração atinge seu pico máximo e, em seguida, começa a diminuir à medida que essas variáveis continuam a aumentar. O ponto ótimo foi obtido com temperatura de 55 °C e proporção etanol: ácido cítrico 50:50 (v/v).

A temperatura é um dos parâmetros mais influentes na eficiência de extração e na estabilidade das antocianinas. Embora este trabalho seja o primeiro estudo visando a otimização de extração de antocianinas de borra de vinho por ELP a determinação dos parâmetros ideais de extração por ELP em outros subprodutos de uva e vinho como as cascas e bagaço de uva tem sido demonstrado na literatura. Enquanto alguns estudos indicam que temperaturas acima de 110 °C podem diminuir o teor de antocianinas devido a reações de oxidação e degradação térmica (Ju; Howard, 2003), outros pesquisadores sugerem a temperatura ótima de extração de 100 °C (Vergara-Salinas *et al.*, 2013; Vergara-Salinas *et al.*, 2015), assim como 80 °C como a melhor escolha (Stavikova *et al.*, 2011). A discrepância entre os resultados pode ser explicada

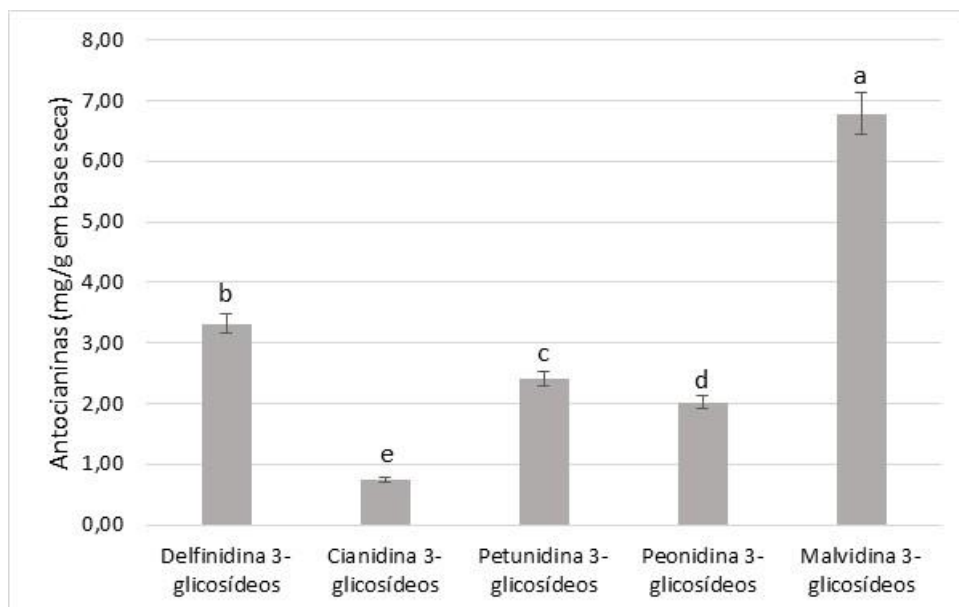
pelas diversas condições de tempo de extração e número de ciclos utilizados no ELP. Além disso, estudos apontaram 65 °C como a temperatura ideal para a extração de antocianinas usando solventes alternativos, como solventes eutéticos profundos (DES) utilizando outras tecnologias de como micro-ondas e ultrassom (Bubalo *et al.*, 2016).

As misturas de água e álcool mostraram-se mais eficazes que os solventes utilizados individualmente, sendo comum acidificar o solvente a fim de melhorar a extração das antocianinas (Petreska Stanoeva *et al.*, 2020; Idham *et al.*, 2022). Os ácidos são indispensáveis para manter um pH baixo, proporcionando um ambiente no qual as antocianinas permanecem na sua forma mais estável, cátion *flavylium*. Pesquisadores avaliaram a influência do pH na extração de antocianinas do bagaço de uva (*Vitis vinífera L.*) e pode ser observado que em pH reduzido (1,8), houve aumento significativo na concentração de antocianinas no extrato de bagaço de uva (Bredun *et al.*, 2023).

3.6 IDENTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS INDIVIDUAIS EM EXTRATO DE BORRA DE VINHO

Análise por cromatografia líquida foi realizada para identificar e quantificar as antocianinas individuais presentes no extrato obtido com as condições do ponto ótimo da extração por líquido pressurizado. O ponto ótimo foi obtido com temperatura de 55 °C e proporção etanol: ácido cítrico 50:50 (v/v). (Figura 3.7). A Figura 3.8 apresenta o perfil de antocianinas no extrato da borra de vinho tinto após extração por líquido pressurizado.

Figura 3.8 - Perfil de antocianinas da borra de vinho.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A literatura demonstra que os principais compostos presentes nas uvas e vinhos tintos, assim como nos subprodutos da vinificação são as antocianinas-3-O-glicosídeo (Jackson, 2020). No presente estudo foram quantificadas 5 antocianinas, a malvidina 3-glicosídeos (6,78 mg/g $\pm$ 0,12) em maior concentração, delfinidina 3-glicosídeos (3,32 mg/g $\pm$ 0,03) e petunidina 3-glicosídeos (2,41 mg/g $\pm$ 0,03), peonidina-3-glicosídeos (2,02 mg/g $\pm$ 0,02) e em menor concentração a cianidina 3-glicosídeos (0,73 mg/g $\pm$ 0,01). A concentração total de antocianinas foi determinada somando as concentrações individuais, resultando em uma concentração total de 15,26 $\pm$ 0,21 mg/ g de peso seco no extrato analisado.

A otimização do método ELP mostrou resultados superiores, alcançando concentrações de antocianinas mais elevadas do que as reportadas em outros estudos. Costa-Pérez *et al.* (2023), avaliaram a concentração de antocianinas na variedade de borras de vinho Monastrell, utilizando para um método de extração sólido-líquido convencional onde 100 mg da amostra foi misturada com 1 mL de metanol acidificado: água (50:50 v/v), sonicada por 60 min, mantida *overnight* e sonicada novamente por 60 min. A concentração total de antocianinas alcançada foi de 0,33 mg/ g (peso seco). As concentrações obtidas foram significativamente inferiores às alcançadas com o método ELP otimizando.

Umsza-Guez *et al.* (2023) também otimizaram um método para a extração de antocianinas de borras de vinho, porém usando extração assistida por ultrassom. As condições de extração otimizadas utilizaram 0,25 g da amostra foram extraídos com 25 mL de solvente

etanol (100%) a 40 °C. A concentração total de antocianinas alcançada nesse estudo foi de aproximadamente 1,5 mg/g (peso seco), também muito inferior à obtida neste trabalho. O método de extração ELP demonstrou eficiência na obtenção de maiores concentrações de antocianinas nas borras de vinho em comparação com métodos previamente relatados na literatura. Isto foi alcançado sob condições de extração mais limpas, tornando-se uma abordagem promissora para a extração verde de antocianinas de borras de vinho.

Com base nos resultados apresentados, é evidente que o extrato da borra de vinho representa uma fonte abundante de antocianinas, o qual apresenta notável potencial de aplicação em diversas indústrias, como alimentícia, cosmética e farmacêutica. Além disso, as antocianinas possuem diversas propriedades bioativas, incluindo atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e cardioprotetora (Barcia *et al.*, 2014; Landeka *et al.*, 2017), o que amplia significativamente as possibilidades de utilização das borras de vinho ricas em antocianinas. Esses resultados ressaltam não apenas o valor comercial das borras de vinho que são um subproduto de processamento da uva, mas também sua relevância no contexto da saúde e do bem-estar humano, oferecendo novas oportunidades para o desenvolvimento de produtos com benefícios adicionais.

É importante destacar que derivados da delphinidina (delphinidina 3-O-(6"-p-acetilglucosídeo e delphinidina 3-O-(6"-p-cumaroil-glicosídeo), cianidina (cianidina 3-O-(6"-p-acetilglucosídeo), petunidina (petunidina 3-O-(6"-p-coumaroil-glicosídeo) e malvidina (malvidina-3-O-6"-acetil-glicosídeo) também foram identificados por outros pesquisadores em amostras de borra do vinho (Romero-Díez *et al.*, 2018; Romero-Díez *et al.*, 2019).

Os resultados obtidos no presente estudo para o perfil de antocianinas no extrato da borra de vinho demonstram que o processo de extração verde (ELP) pode ser utilizado pela indústria como uma tecnologia promissora para obtenção compostos bioativos valiosos, de acordo com uma abordagem de economia circular. Além disso, o aproveitamento desses subprodutos através de métodos ambientalmente seguros não apenas promove um equilíbrio ambiental, mas também resulta na obtenção de extratos altamente valorizados, os quais apresentam notáveis propriedades bioativas, tornando-se potenciais aditivos de grande relevância.

3.7 IDENTIFICAÇÃO DE POLIFENÓIS INDIVIDUAIS EM EXTRATO DE BORRA DE VINHO

A tabela 3.7 apresenta a composição de polifenóis individuais no extrato da borra de vinho. A borra de vinho revelou um potencial fenólico significativo, com a identificação de 15 compostos fenólicos em sua composição, evidenciando sua relevância como uma fonte valiosa de compostos bioativos com potencial de aplicação na indústria de alimentos.

Tabela 3.7 – Perfil de polifenóis do extrato da borra de vinho.

Polifenóis (mg/g em peso seco)	Borra de vinho
<i>Ácidos hidroxibenzoicos</i>	
Gálico	0,56 ^e ± 0,03
Protocateico	0,13 ^h ± 0,01
Vanílico	0,20 ^g ± 0,03
Seringico	0,09 ⁱ ± 0,02
<i>Ácidos hidroxicinâmicos</i>	
Caftárico	2,03 ^b ± 0,08
p-cumárico	0,03 ^j ± 0,01
Caféico	0,14 ^h ± 0,01
Ferúlico	0,09 ⁱ ± 0,01
<i>Flavanóis</i>	
Catequina	0,87 ^d ± 0,01
Epicatequina	3,53 ^a ± 0,07
<i>Flavonóis</i>	
Mirecetina	0,28 ^f ± 0,01
Quercetina	0,97 ^c ± 0,01
Campferol	0,28 ^f ± 0,02
<i>Outros</i>	
<i>Trans</i> -resveratrol	0,13 ^h ± 0,02
Tirosol	0,23 ^g ± 0,01
<i>Capacidade Antioxidante (µm/L)</i>	
ABTS ^{·+}	5270,39 ± 0,30

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Os resultados demonstraram que a epicatequina (4,00 mg/g) foi o composto fenólico majoritário no extrato de borras de vinho obtidas por ELP, seguido do ácido caftárico (2,03 mg/g) e da catequina (0,87 mg/g). Os flavanóis foram os principais compostos fenólicos detectados no extrato de borras de vinho obtidas por ELP em relação ao conteúdo total de compostos, representando 46%, seguidos dos ácidos hidroxicinâmicos representando 24%. Estudos semelhantes, que determinaram o perfil fenólico das borras de vinho tinto, também encontraram flavonóis como a classe de polifenóis majoritários nas amostras, mesmo utilizando métodos de extração distintos como, extração assistida por enzimas, ultrassom e micro-ondas

(Romero-Díez *et al.*, 2018; López-Fernández-Sobrinho *et al.*, 2021), no entanto em concentrações muito inferiores as encontradas nesse estudo. Outros estudos demonstram que os flavanóis como a quercetina são os compostos majoritários neste subproduto. Por exemplo, Reis *et al.* (2016) caracterizaram borras de *Vitis vinifera* L. cv Pinot Noir e relataram níveis de cerca de 40 µg/g para quercetina, enquanto o principal ácido fenólico foi o ácido caféico com concentração em torno de 6 µg/g.

Os estilbenos são pouco relatados nas borras de vinho. No entanto, nesse estudo foi possível quantificar a presença de *trans*-resveratrol (0,13 mg/g) no extrato de borras de vinho obtidas por ELP. Apesar de poucos estudos identificarem os estilbenos em borras de vinho, diversas pesquisas indicam que as cascas de uva possuem uma concentração aproximada de 50–100 µg/g de resveratrol, enquanto no vinho tinto essa concentração varia entre 1,5 e 3,0 mg/L. As propriedades bioativas do resveratrol e seus derivados destacam seu potencial como agente antimutagênico, antioxidante, anti-inflamatório e antiproliferativo (Rockenbach *et al.*, 2011). Além disso a borra de vinho apresentou alta capacidade antioxidante, esse resultado pode ser atribuído à sua rica composição fenólica, incluindo antocianinas. Diante disso, é possível afirmar que o extrato da borra de vinho obtido através da ELP é fonte promissora de antioxidantes naturais para aplicações em alimentos funcionais e suplementos nutricionais.

As diferenças encontradas entre os estudos quanto ao perfil fenólico da borra do vinho podem ser atribuídas à variedade de uva, origem de cultivo, assim como a técnica aplicada no processo de vinificação. Além disso, a técnica de extração aplicada na borra influencia no teor de polifenóis, solventes orgânicos, como metanol ou acetona, são amplamente utilizados para sua extração, no entanto são ambientalmente prejudiciais. A utilização da extração por ELP pode ser empregada devido à sua total compatibilidade com a indústria, potencializando a extração de compostos fenólicos utilizando solventes orgânicos seguros.

As borras de vinho apresentaram alta capacidade antioxidante com valor de $5270,39 \pm 0,30$ µm/L, resultado este que pode ser atribuído aos compostos fenólicos e as antocianinas. Foram observadas correlações positivas ($p < 0,05$) entre a atividade antioxidante e as cinco antocianinas identificadas no extrato de borras de vinho. A atividade antioxidante apresentou alta correlação ($r > 0,90$) com malvidina 3-glicosídeos, delphinidina 3-glicosídeos, petunidina 3-glicosídeos, peonidina-3-glicosídeos e cianidina-3-glicosídeos. Este resultado é significativo, indicando uma relação linear entre as duas variáveis estudadas, demonstrando que as antocianinas contribuem significativamente para a capacidade antioxidante da amostra. Nos alimentos, uma elevada concentração de antocianinas melhora os atributos sensoriais dos

alimentos, incluindo cor e sabor, ao mesmo tempo que aumenta o seu valor nutricional e os benefícios para a saúde associados (Nascimento *et al.*, 2023; Gamage *et al.*, 2024).

3.8 EFEITO DA DIGESTÃO *IN VITRO* SOBRE A COMPOSIÇÃO DE ANTOCIANINAS DO EXTRATO DA BORRA DE VINHO

A digestão simulada do trato gastrointestinal *in vitro* das amostras de borra quanto ao perfil de antocianinas monoméricas está apresentada na Tabela 3.8. A análise da bioacessibilidade das antocianinas após a fase oral revelou que, em relação ao controle, a bioacessibilidade manteve-se acima de 90% para todos os compostos analisados, com diferença significativa entre as antocianinas ($p < 0,05$). Este dado indica uma estabilidade das antocianinas durante a fase oral do processo digestivo, sugerindo que estes compostos resistem às condições presentes na boca, como a saliva e as enzimas iniciais da digestão (Fang, 2014). Durante a fase de digestão gástrica, a mudança na bioacessibilidade das antocianinas foi de cerca de 60%, exceto para cianidina-3-glicosídeo onde a bioacessibilidade foi de 67,8%. Na fase intestinal, o teor de antocianinas foi significativamente reduzido ($< 0,05$), o índice de bioacessibilidade foi de 1,27% para delphinidina e 0,67% para malvidina, o teor de cianidina, petunidina e peonidina não foram quantificados na fase intestinal. Este comportamento pode ser atribuído a ocorrência de alterações na estrutura química, decorrentes de degradação, aumento ou redução da solubilidade ou interações com outras substâncias que influenciam a sua concentração e consequente bioacessibilidade (McGhie; Walton, 2007). Tao *et al.* (2023), destacaram o desempenho desse composto na digestão *in vitro* e indicaram que a interação entre isolado proteico de soro glicosilado e cianidina-3-glicosídeo melhorou a estabilidade térmica e a atividade antioxidante, sugerindo que a presença dessa antocianina pode proteger as proteínas contra degradação oxidativa durante a digestão *in vitro* e reduzir sua capacidade de desencadear reações alérgicas.

Tabela 3.8 - Composição de antocianinas individuais (mg/g) do extrato da borra de vinho após simulação gastrointestinal.

Antocianinas	Controle	Fração Oral	Fração Gástrica	Fração intestinal	IB (%)
Delfinidina 3-glicosídeos	1,57 ^b ± 0,03	1,46 ^b ± 0,03	0,87 ^b ± 0,01	0,02 ^a ± 0,01	1,27 ^a ± 0,01
Cianidina 3-glicosídeos	0,30 ^e ± 0,01,	0,28 ^e ± 0,01	0,19 ^e ± 0,01	<0,1*	-
Petunidina 3-glicosídeos	1,14 ^c ± 0,02	1,05 ^c ± 0,02	0,65 ^c ± 0,01	<0,1	-
Peonidina 3-glicosídeos	0,96 ^d ± 0,02	0,88 ^d ± 0,02	0,54 ^d ± 0,00	<0,1	-
Malvidina 3-glicosídeos	3,37 ^a ± 0,07	3,12 ^a ± 0,06	1,92 ^a ± 0,01	0,02 ^a ± 0,01	0,67 ^b ± 0,01

Valores apresentados como média ± desvio padrão. Os resultados das antocianinas monoméricas foram expressos em mg/g em base seca. Letras diferentes na mesma coluna indica diferença significativa entre os experimentos ($p < 0,05$). IB: índice de bioacessibilidade. *Valor inferior ao limite de quantificação do método (LOQ <0,1)*.

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Os benefícios das antocianinas para a saúde foram comprovados em diversos estudos realizados *in vitro*, em modelos animais e em seres humanos, abrangendo uma variedade de funções que incluem combate ao estresse oxidativo, atividade antimicrobiana e prevenção ou tratamento de doenças neurodegenerativas, cardíacas e metabólicas (Khoo et al., 2019; Tarone, Cazarin, e Marostica Junior, 2020; Tosti, Bertozzi e Fontana, 2018). Adicionalmente, outros estudos observaram que as antocianinas apresentam um efeito protetor para a visão, juntamente com os carotenóides e a vitamina A, esses compostos estão associados à prevenção e à redução do risco de doenças como a degeneração macular relacionada à idade, que é uma das principais causas de perda de visão em idosos. Além disso, podem contribuir para a proteção contra o estresse oxidativo na retina e melhorar a função visual em condições de baixa luminosidade. (Khoo et al., 2019; Matsumoto et al., 2006), e influenciam positivamente a microbiota intestinal ao estimular potencial de probióticos, como bifidobactérias e lactobacilos, proporcionando benefícios à saúde humana (Mattioli et al., 2020; Park et al., 2019).

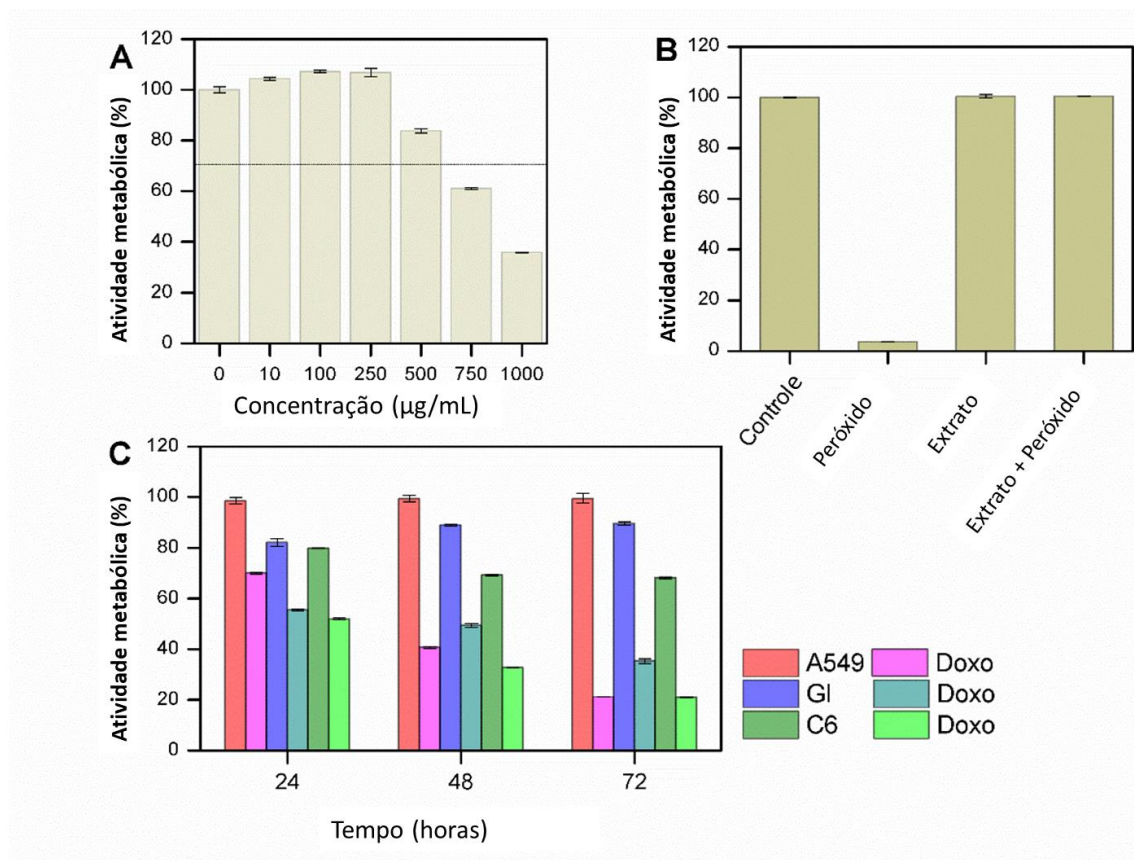
Ou et al., (2022) investigaram os efeitos do extrato de antocianina de arroz negro na microestrutura do pão e sua relação com a digestibilidade do amido. A incorporação deste extrato resultou numa redução dependente da dose na digestibilidade do amido, que pode contribuir para uma liberação mais lenta de glicose no sangue. Isso pode ser benéfico para o controle glicêmico, um fator importante na prevenção e gestão de doenças metabólicas como a diabetes. Isso demonstra o vasto potencial de um extrato rico em antocianinas em aplicações

nutricionais e terapêuticas, evidenciando a importância de estudos que exploram tanto a bioacessibilidade quanto a digestibilidade desses compostos.

3.9 EFEITO DAS ANTOCIANINAS DO EXTRATO DA BORRA DE VINHO NA VIABILIDADE CELULAR

A avaliação da atividade biológica de extratos é fundamental para determinar seu potencial terapêutico e identificar possíveis aplicações. Um dos principais ensaios utilizados para essa avaliação é o ensaio de citotoxicidade, que segue as diretrizes estabelecidas pela norma ISO 10.993/5 (2009). Esse ensaio permite determinar o impacto de substâncias sobre a viabilidade celular, fornecendo *insights* importantes sobre sua segurança e toxicidade. Além disso, a avaliação da proteção e atividade antitumoral desses extratos é crucial para identificar seu potencial no tratamento de doenças (Lopez-Corona *et al.*, 2022; Soni *et al.*, 2023). Neste estudo, investigamos pela primeira a atividade biológica de extratos de borra de vinho obtidos por ELP (Figura 3.9).

Figura 3.9 - Ensaio de citotoxicidade, proteção e atividade antitumoral de extratos de borra de vinho.



(A) Citotoxicidade de células L929 tratadas com extratos; (B) Viabilidade de células L929 tratadas com extratos com exposição concomitante ao H₂O₂; (C) Atividade antitumoral (%) de extratos para células de adenocarcinoma pulmonar (A549) e glioma de camundongo (GL261 E C6).

O efeito citotóxico do contato direto sobre a proliferação fibroblástica foi avaliado com diferentes concentrações de extrato (Figura 9A). De acordo com a ISO 10993-5:2009 (2009), a viabilidade celular mínima para células L929 é de 70%; portanto, os resultados apresentados indicam citotoxicidade nas concentrações de 750 e 1000 µg/mL do extrato de borra de vinho, uma vez que apresentaram viabilidade inferior ao preconizado. Em estudo de Wang *et al.* (2017), com o uso de células L929 foi verificado que as antocianinas do extrato de mirtilo apresentavam citotoxicidade (viabilidade inferior a 70%) na concentração de 800 µg/mL. A literatura demonstra que a presença de altas concentrações de antocianinas, embora geralmente reconhecida por suas propriedades antioxidantes e potencialmente benéficas à saúde, pode tornar-se citotóxica em níveis excessivos. Esses compostos podem interferir em processos celulares normais e até mesmo causar danos celulares irreparáveis, como apoptose ou necrose celular (Xie *et al.*, 2012). Além disso, durante o processo de extração ou armazenamento do extrato, podem ocorrer reações que resultam na formação de produtos de degradação tóxicos, contribuindo para a citotoxicidade observada. Diante disso, considerando o ineditismo desse

resultado é crucial realizar uma análise mais aprofundada para determinar a causa exata da citotoxicidade e investigar possíveis medidas corretivas, visando garantir a segurança do uso desse extrato em aplicações futuras.

Com base nos resultados obtidos para a citotoxicidade, os ensaios para avaliar a proteção e atividade antitumoral foram conduzidos utilizando a concentração de 500 µg/mL do extrato. A escolha desta concentração foi com base na análise de citotoxicidade de células L929 (Figura 9A), que demonstrou não haver citotoxicidade significativa nesta concentração.

De acordo com a Figura 9B o extrato foi capaz de proteger as células dos danos causados pelo peróxido. O peróxido, sendo uma espécie reativa de oxigênio, pode induzir estresse oxidativo nas células, resultando em danos às biomoléculas, como proteínas, lipídios e DNA. Os compostos presentes no extrato atuam como antioxidantes, capturando os radicais livres e impedindo que causem danos às células. Portanto, quando as células foram pré-tratadas com o extrato de borra de vinho antes da exposição ao peróxido, a atividade antioxidante do extrato ajudou a proteger as células, reduzindo os danos oxidativos e preservando sua viabilidade e integridade funcional. Esses resultados demonstram o potencial do extrato de borra de vinho como um agente protetor contra o estresse oxidativo e sugerem seu possível uso na prevenção ou tratamento de condições relacionadas ao estresse oxidativo, como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer (Tena; Martín; Asuero, 2020; Luzardo-Ocampo *et al.*, 2021).

A concentração de 500 µg/mL não causou danos celulares significativos na célula de adenocarcinoma de pulmão (A549), como indicado pela ausência de redução na atividade metabólica, conforme demonstrado na Figura 9C. Isso sugere que, para as células A549, essa concentração do extrato de borra de vinho não foi citotóxica e não afetou adversamente sua viabilidade ou função metabólica. No entanto, para as células de glioma (GL e C6), foi observada uma redução na atividade metabólica de 15% e 20%, respectivamente. Essa diminuição na atividade metabólica pode indicar uma resposta específica das células de glioma ao extrato, possivelmente relacionada às propriedades bioativas dos compostos presentes na borra de vinho. Embora a redução na atividade metabólica sugira uma possível resposta adversa das células de glioma ao tratamento com o extrato, é importante ressaltar que a viabilidade celular ainda não foi comprometida, o que sugere que essa concentração pode ter um efeito moderado nas células de glioma sem induzir citotoxicidade aguda. Esses resultados destacam a importância da avaliação específica do extrato em diferentes linhagens celulares para compreender melhor seus efeitos e potenciais aplicações terapêuticas.

4. CONCLUSÃO

O estudo das borras de vinho possibilitou observar que a amostra obtida através do processo de desidratação convectiva a 40 °C, acarretou em 420 minutos de secagem e apresentou baixo teor de umidade, removendo 88% de água da amostra durante o processo. As curvas de secagem apresentaram taxa decrescente, seguido por um período de taxa constante. Dentre os diferentes métodos de extração avaliados para a borra de vinho após secagem, observou-se que o método de extração por líquido pressurizado em modo estático apresentou maior teor de antocianinas monoméricas totais no extrato, sendo o método selecionado para aplicação e obtenção de um extrato rico em antocianinas. Entre os parâmetros avaliados para a otimização do processo de extração, a temperatura de 55 °C e proporção etanol: ácido cítrico 50:50 (v/v) apresentou maior eficiência na extração de antocianinas. O perfil bioativo das borras de vinho indicou diferenças na composição fenólica, tais como flavanóis, antocianinas, flavonóis e ácidos fenólicos, o que pode direcionar as aplicações tecnológicas e funcionais desse subproduto.

A análise de digestão *in vitro* do extrato da borra de vinho mostrou que as antocianinas são bioacessíveis na fase oral e na fase gástrica, com redução de concentração ao longo da digestão, especialmente na fase intestinal. Esses resultados ressaltam a relevância de desenvolver estratégias na indústria de alimentos para preservar esses compostos durante o processo digestivo, visando maximizar seus benefícios à saúde e promover inovação em produtos alimentícios funcionais que mantenham a integridade nutricional e bioativa. Além disso, este estudo investigou a atividade biológica dos extratos de borra de vinho, revelando um equilíbrio entre seus potenciais terapêuticos e efeitos citotóxicos. Enquanto altas concentrações (1000 µg/mL) apresentaram citotoxicidade, níveis moderados (500 µg/mL) protegeram células contra estresse oxidativo. Isso destaca a importância de dosar e entender a bioatividade dos compostos fenólicos presentes nesse subproduto.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho apresentou a otimização das condições para extração de antocianinas do bagaço de uva com solução de ácido cítrico, sendo este um solvente não orgânico, seguro e amplamente utilizado para o processamento de alimentos. Utilizando planejamento central composto foi observado a melhor condição de extração para o bagaço de uva com 10 mL de solução de ácido cítrico em pH 1,8. A aplicação de crioconcentração no extrato de bagaço de uva demonstrou ser um método eficaz para concentração de compostos bioativos. Os concentrados obtidos nos três estágios do processo apresentaram maiores teores de polifenóis totais, antocianinas totais, e um aumento do teor de sólidos solúveis em relação ao extrato inicial. A maior eficiência no processo foi observada para os concentrados obtidos na primeira e na segunda etapa.

Os resultados do estudo sobre as borras de vinho mostraram que após processo de desidratação a 40 °C por 420 minutos, foi possível reduzir 88% da umidade inicial. o método de extração por líquido pressurizado em modo estático apresentou melhor resultado para antocininas monomericas totais em comparação, resultando em um extrato rico em antocianinas monoméricas. A extração ótima foi a 55 °C utilizando uma solução de etanol e ácido cítrico (0,1 mol/L) em proporção de 50:50 (v/v). As antocianinas quantificadas foram delfinidina-3-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo, sendo a malvidina a majoritária. Análises da bioacessibilidade do extrato indicou que as antocianinas permaneceram acessíveis e estáveis durante a fase oral e gástrica da digestão gastrointestinal simulada (com índice de bioacessibilidade de 90% na fase oral e 60% na fase gástrica). O extrato de borra de vinho demonstrou ser seguro em ensaios de citotoxicidade em células L292 até uma concentração de 500 µg/mL e apresentou propriedades citoprotetoras nesta concentração em condições de estresse oxidativo induzido por H₂O₂.

O estudo do bagaço de uva e da borra de vinho é crucial para a indústria de alimentos, não apenas por promover o aproveitamento de resíduos, mas também por contribuir para a economia circular. A valorização desses subprodutos, através da extração e aproveitamento de compostos bioativos, pode resultar em benefícios ambientais, econômicos e de saúde, reforçando a importância de integrar estratégias de sustentabilidade na indústria de alimentos. A exploração desses resíduos não só reduz o impacto ambiental associado ao seu descarte, mas também potencializa a criação de novos produtos com alto valor agregado, incentivando assim a inovação e a sustentabilidade no setor.

Considerando os resultados obtidos, estudos futuros direcionados à aplicação dos subprodutos da vinificação em diferentes matrizes são sugeridos. A avaliação da viabilidade dos compostos fenólicos, como as antocianinas, em diferentes produtos e a investigação do potencial funcional e comercial desses compostos ampliam o entendimento sobre suas propriedades e benefícios, além de contribuir para o desenvolvimento de produtos inovadores e com valor agregado.

REFERÊNCIAS

- ADORNO, W. T., REZZADORI, K., AREND, G. D., CHAVES, V. C., REGINATTO, F. H., DI LUCCIO, M., PETRUS, J. C. Enhancement of phenolic compounds content and antioxidant activity of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) juice by block freeze concentration technology. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 3, p. 781-787, 2017.
- AIDER, M., DE HALLEUX, D. Passive and microwave-assisted thawing in maple sap cryoconcentration technology. **Journal of Food Engineering**, v. 85, n. 1, p. 65-72, 2008a.
- AIDER, M., DE HALLEUX, D. Production of concentrated cherry and apricot juices by cryoconcentration technology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 10, p. 1768-1775, 2008b.
- AIDER, M., OUNIS, W. B. Skim milk cryoconcentration as affected by the thawing mode: gravitational vs. microwave-assisted. **International journal of food science & technology**, v. 47, n. 1, p. 195-202, 2012.
- AIDER, M.; DE HALLEUX, D. Cryoconcentration technology in the bio-food industry: Principles and applications. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, n. 3, p. 679- 685, 2009.
- AIDER, M; DE HALLEUX, D.; AKBACHE, A. Whey cryoconcentration and impact on its composition. **Journal of Food Engineering**, v. 82, n. 1, p. 92-102, 2007.
- ALIAÑO-GONZÁLEZ, M. J.; FERREIRO-GONZÁLEZ, M.; ESPADA-BELLIDO, E.; CARRERA, C.; PALMA, M.; ÁLVAREZ, J. A.; BARBERO, G. F. Extraction of anthocyanins and total phenolic compounds from açai (*euterpe oleracea* mart.) using an experimental design methodology. part 1: Pressurized liquid extraction. **Agronomy**, v. 10, n. 2, p. 183, 2020.
- ÁLVAREZ, A.; POEJO, J.; MATIAS, A. A.; DUARTE, C. M.; COCERO, M. J.; MATO, R. B. Microwave pretreatment to improve extraction efficiency and polyphenol extract richness from grape pomace. Effect on antioxidant bioactivity. **Food and Bioproducts Processing**, v. 106, p. 162-170, 2017.
- ALVAREZ-CASAS, M., PÁJARO, M., LORES, M., GARCIA-JARES, C. 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**, v. 242, p. 655-665, 2016.
- AMAYA-CHANTACA; FLORES-GALLEGOS, A. C.; ILINÁ, A.; AGUILAR, C. N.; VERMA, D. K.; BARANWAL, D.; CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M. L. Wine waste as a potential source of bioactive compounds. In: **Innovations in Fermentation and Phytopharmaceutical Technologies**. Elsevier, 2022. p. 361-380.
- ANTÓN-DÍAZ, M. J., VALLES, B. S., MANGAS-ALONSO, J. J., FERNÁNDEZ-GARCÍA, O., PICINELLI-LOBO, A. Impact of different techniques involving contact with lees on the volatile composition of cider. **Food Chemistry**, v. 190, p. 1116-1122, 2016.

ANVISA. Resolução RDC nº 24, de 15 de junho de 2011. Regulamenta a informação nutricional complementar. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 17 jun. 2011.

ANVISA. Resolução RDC nº 240, de 26 de julho de 2018. Regulamenta a alegação de propriedade funcional e/ou de saúde em alimentos. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 27 jul. 2018.

ANVISA. Resolução RDC nº 27, de 6 de agosto de 2010. Dispõe sobre a comprovação da segurança e eficácia de probióticos adicionados a alimentos. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 9 ago. 2010.

AOAC. Association of Official Analytical Chemistry. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry. 18. ed. Arlington: Washington, 2005.

BAKURADZE, T.; TAUSEND, A.; GALAN, J.; GROH, I. A. M.; BERRY, D.; TUR, J. A.; RICHLING, E. Antioxidative activity and health benefits of anthocyanin-rich fruit juice in healthy volunteers. **Free Radical Research**, v. 53, sup1, p. 1045-1055, 2019.

BALDE, A., AİDER, M. Effect of cryoconcentration, reverse osmosis and vacuum evaporation as concentration step of skim milk prior to drying on the powder properties. **Powder Technology**, v. 319, p. 463-471, 2017.

BAMBA, B. S. B. SHI, J., TRANCHANT, C. C., XUE, S. J., FORNEY, C. F., LIM, L. T. Influence of extraction conditions on ultrasound-assisted recovery of bioactive phenolics from blueberry pomace and their antioxidant activity. **Molecules**, v. 23, n. 7, p.1685, 2018.

BARBA, F. J., ZHU, Z., KOUBAA, M., SANT'ANA, A. S., ORLIEN, V. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 49, p. 96-109, 2016.

BARCIA, M. T.; PERTUZATTI, P. B.; RODRIGUES, D.; GÓMEZ-ALONSO, S.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; GODOY, H. T. Occurrence of low molecular weight phenolics in *Vitis vinifera* red grape cultivars and their winemaking by-products from São Paulo (Brazil). **Food Research International**, v. 62, p. 500-513, 2014.

BAYDAR, N. G., ÖZKAN, G.; ÇETIN, E. S. Characterization of grape seed and pomaceoil extracts. **Grasas y aceites**, v. 58, n. 1, p. 29-33, 2007.

BENVENUTTI, L.; SANCHEZ-CAMARGO, A. del P.; ZIELINSKI, A. A. F.; FERREIRA, S. R. S. NADES as potential solvents for anthocyanin and pectin extraction from *Myrciaria cauliflora* fruit by-product: In silico and experimental approaches for solvent selection. **Journal of Molecular Liquids**, v. 315, p. 113761, 2020.

BENVENUTTI, L.; ZIELINSKI, A. A. F.; FERREIRA, S. R. S. Pressurized aqueous solutions of deep eutectic solvent (DES): A green emergent extraction of anthocyanins from a Brazilian berry processing by-product. **Food Chemistry: X**, v. 13, p. 100236, 2022.

BERES, C., COSTA, G. N., CABEZUDO, I., DA SILVA-JAMES, N. K., TELES, A. S., CRUZ, A. P., FREITAS, S. P. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. **Waste management**, v. 68, p. 581-594, 2017.

BERK, Z. Food process engineering and technology. **Academic press**, 2018.

BORDIGA, M. (Ed.). Valorization of wine making by-products. CRC Press, 2016.

BRAGA, A. R. C., MURADOR, D. C., DE SOUZA MESQUITA, L. M., DE ROSSO, V. V. Bioavailability of anthocyanins: Gaps in knowledge, challenges and future research. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 68, p. 31-40, 2018.

BRAVO, F. I., MAS-CAPDEVILA, A., LÓPEZ-FERNÁNDEZ-SOBRINO, R., TORRES-FUENTES, C., MULERO, M., ALCAIDE-HIDALGO, J. M., MUGUERZA, B. Identification of novel antihypertensive peptides from wine lees hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 366, p. 130690, 2022.

BREDUN, M. A.; PRESTES, A. A.; PANCERI, C. P.; PRUDÊNCIO, E. S.; BURIN, V. M. Bioactive compounds recovery by freeze concentration process from winemaking by-product. **Food Research International**, v. 173, p. 113220, 2023.

BRODKORB, A., EGGER, L., ALMINGER, M., ALVITO, P., ASSUNÇÃO, R., BALLANCE, S., ... RECIO, I. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature protocols**, v. 14, n. 4, p. 991-1014, 2019.

BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; BARROS NETO, B. de. Statistical design-chemometrics. Elsevier, 2006.

BUBALO, M. C.; ČURKO, N.; TOMAŠEVIĆ, M.; GANIĆ, K. K.; REDOVNIKOVIĆ, I. R. Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. **Food Chemistry**, v. 200, p. 159-166, 2016.

BUCIĆ-KOJIĆ, A., FERNANDES, F., SILVA, T., PLANINIĆ, M., TIŠMA, M., ŠELO, G., ANDRADE, P. B. Enhancement of the anti-inflammatory properties of grape pomace treated by *Trametes versicolor*. **Food & Function**, v. 11, n. 1, p. 680-688, 2020.

BURIN, V. M.; FERREIRA-LIMA, N. E.; PANCERI, C. P.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of different extraction methods. **Microchemical Journal**, v. 114, p. 155-163, 2014.

BUSTAMANTE, M. A., MORAL, R., PAREDES, C., PÉREZ-ESPINOSA, A., MORENO-CASELLES, J., PÉREZ-MURCIA, M. D. (2008). Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. **Waste management**, v. 28, n. 2, p. 372-380, 2008.

BUSTAMANTE, M. A.; MORAL, R.; PAREDES, C.; PÉREZ-ESPINOSA, A.; MORENO-CASELLES, J.; PÉREZ-MURCIA, M. D. Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. **Waste Management**, v. 28, n. 2, p. 372-380, 2008.

CAICEDO-LOPEZ, L. H., LUZARDO-OCAMPO, I., CUELLAR-NUÑEZ, M. L., CAMPOS-VEGA, R., MENDOZA, S., LOARCA-PIÑA, G. Effect of the in vitro gastrointestinal digestion on free-phenolic compounds and mono/oligosaccharides from *Moringa oleifera* leaves: Bioaccessibility, intestinal permeability and antioxidant capacity. **Food Research International**, v. 120, p. 631-642, 2019.

CALDAS, T. W., MAZZA, K. E., TELES, A. S., MATTOS, G. N., BRÍGIDA, A. I. S., CONTE-JUNIOR, C. A., TONON. Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 86-91, 2018.

CĂLINOIU, L. F., VODNAR, D. C. Whole grains and phenolic acids: A review on bioactivity, functionality, health benefits and bioavailability. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1615, 2018.

CANALEJO, D., GUADALUPE, Z., MARTÍNEZ-LAPUENTE, L., AYESTARÁN, B., PÉREZ-MAGARIÑO, S. Optimization of a method to extract polysaccharides from white grape pomace by-products. **Food Chemistry**, v. 365, p. 130445, 2021.

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, n. 10, p. 4019-4025, 2005.

CANELLA, M. H. M., DE BONA MUÑOZ, I., PINTO, S. S., RODRIGUES, G., DE LIZ, C. M. O. M., AMBONI, R. D. D. M. C., PRUDENCIO, E. S. Research Article Use of Concentrated Whey by Freeze Concentration Process to Obtain a Symbiotic Fermented Lactic Beverage. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 14, n. 2, p. 56-68, 2018.

CAPONIO, G. R., MIOLLA, R., VACCA, M., DIFONZO, G., DE ANGELIS, M. Wine lees as functional ingredient to produce biscuits fortified with polyphenols and dietary fibre. **LWT**, v. 198, p. 115943, 2024.

CARBONELL-CAPELLA, J. M., BUNIEWSKA, M., BARBA, F. J., ESTEVE, M. J., FRÍGOLA, A. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 2, p. 155-171, 2014.

CARRANZA-MÉNDEZ, R. C.; CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M. L.; SEPÚLVEDA-TORRE, L.; AGUILAR, C. N.; GOVEA-SALAS, M.; RAMOS-GONZÁLEZ, R. Production of single cell protein from orange peel residues by *Candida utilis*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 40, p. 102298, 2022.

CASAS, L., MANTELL, C., RODRÍGUEZ, M., DE LA OSSA, E. M., ROLDÁN, A., DE ORY, I., BLANDINO, A. Extraction of resveratrol from the pomace of Palomino finograpes by supercritical carbon dioxide. **Journal of food engineering**, v. 96, n. 2, p. 304-308, 2010.

CASAS-FORERO, N., ORELLANA-PALMA, P., PETZOLD, G. Influence of block freeze concentration and evaporation on physicochemical properties, bioactive compounds and

antioxidant activity in blueberry juice. **Food Science and Technology**, v. 40, n. suppl 2, p. 387-394, 2020.

CASSIDY, A. Berry anthocyanin intake and cardiovascular health. **Molecular aspects of medicine**, v. 61, p. 76-82, 2018.

CHENG, V. J., BEKHIT, A. E. D. A., MCCONNELL, M., MROS, S., ZHAO, J. (2012). Effect of extraction solvent, waste fraction and grape variety on the antimicrobial and antioxidant activities of extracts from wine residue from cool climate. **Food chemistry**, v. 134, n. 1, p. 474-482, 2012.

CHOWDHARY, P., GUPTA, A., GNANSOUNOU, E., PANDEY, A., CHATURVEDI, P. Current trends and possibilities for exploitation of Grape pomace as a potential source for value addition. **Environmental Pollution**, v. 278, p. 116796, 2021.

CORREA, L. J., RUIZ, R. Y., MORENO, F. L. Effect of falling-film freeze concentration on bioactive compounds in aqueous coffee extract. **Journal of Food Process Engineering**, v. 41, n. 1, p. e12606, 2018.

CORY, H., PASSARELLI, S., SZETO, J., TAMEZ, M., & MATTEI, J. The role of polyphenols in human health and food systems: A mini-review. **Frontiers in nutrition**, v. 5, p. 370438, 2018.

COSME-DE VERA, F. H., SORIANO, A. N., DUGOS, N. P., RUBI, R. V. C. A comprehensive review on the drying kinetics of common tubers. **Applied Science and Engineering Progress**, v. 14, n. 2, p. 146-155, 2021.

COSTA-PÉREZ, A.; MEDINA, S.; SÁNCHEZ-BRAVO, P.; DOMÍNGUEZ-PERLES, R.; GARCÍA-VIGUERA, C. The (Poly) phenolic profile of separate winery by-products reveals potential antioxidant synergies. **Molecules**, v. 28, n. 5, p. 2081, 2023.

CRUPI, P., DIPALMO, T., CLODOVEO, M. L., TOCI, A. T., COLETTA, A. Seedless table grape residues as a source of polyphenols: Comparison and optimization of non- conventional extraction techniques. **European Food Research and Technology**, v. 244, p. 1091-1100, 2018.

CSERI, L., RAZALI, M., POGANY, P., SZEKELY, G. Organic solvents in sustainable synthesis and engineering. In: Green chemistry. **Elsevier**, 2018. p. 513-553.

CZANK, C., CASSIDY, A., ZHANG, Q., MORRISON, D. J., PRESTON, T., KROON, P. A., ... KAY, C. D. Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: a ¹³C-tracer study. **The American journal of clinical nutrition**, v. 97, n. 5, p. 995-1003, 2013.
DA ROCHA, C. B., NOREÑA, C. P. Z. Microwave-assisted extraction and ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from grape pomace. **International Journal of Food Engineering**, v. 16, n. 1-2, 2020.

DANLAMI, J. M., ARSAD, A., AHMAD ZAINI, M. A., SULAIMAN, H. A comparative study of various oil extraction techniques from plants. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 30, n. 6, p. 605-626, 2014.

DE ANDRADE BULOS, R. B.; DA GAMA PAZ, F.; MACHADO, C. G.; TAVARES, P. P. L. G.; DE SOUZA, C. O.; UMSZA-GUEZ, M. A. Scientific and technological research on the use of wine lees. **Food Production, Processing and Nutrition**, v. 5, n. 1, p. 25, 2023.

DE ISEPPI, A.; MARANGON, M.; LOMOLINO, G.; CRAPISI, A.; CURIONI, A. Red and white wine lees as a novel source of emulsifiers and foaming agents. **LWT**, v. 152, p. 112273, 2021.

DE ISEPPI, LOMOLINO, G., MARANGON, M., CURIONI, A. Current and future strategies for wine yeast lees valorization. **Food Research International**, v. 137, p. 109352, 2020.

DE OLIVEIRA, N. A., CORNELIO-SANTIAGO, H. P., FUKUMASU, H., E DE SOUSA SABINO, L. B. et al. Optimization of pressurized liquid extraction and ultrasound methods for recovery of anthocyanins present in jambolan fruit (*Syzygium cumini* L.). **Food and Bioproducts Processing**, v. 127, p. 77-89, 2021.

DE SOUSA SABINO, L. B.; ALVES FILHO, E. G.; FERNANDES, F. A. N.; DE BRITO, E. S.; DA SILVA JÚNIOR, I. J. Optimization of pressurized liquid extraction and ultrasound methods for recovery of anthocyanins present in jambolan fruit (*Syzygium cumini* L.). **Food and Bioproducts Processing**, v. 127, p. 77-89, 2021.

DE SOUSA, M. H.; MORGAN, J. M.; CESCO, K.; FLACH, A.; DE MOURA, N. F. Cytotoxic activity of *Cunila angustifolia* essential oil. **Chemistry & Biodiversity**, v. 17, n. 2, e1900656, 2020.

DEL PILAR GARCIA-MENDOZA, M., ESPINOSA-PARDO, F. A., BASEGGIO, A. M., BARBERO, G. F., JUNIOR, M. R. M., ROSTAGNO, M. A., MARTÍNEZ, J. (2017). Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juçara (*Euterpe edulis* Mart.) residues using pressurized liquids and supercritical fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 119, p. 9-16, 2017.

DELGADO DE LA TORRE, M. P., PRIEGO-CAPOTE, F., LUQUE DE CASTRO, M. D. Tentative identification of polar and mid-polar compounds in extracts from wine lees by liquid chromatography–tandem mass spectrometry in high-resolution mode. **Journal of Mass Spectrometry**, 50(6), 826-837, 2015.

DENG, Q., PENNER, M. H., ZHAO, Y. Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2712-2720, 2011.

DIMOU, C., KOPSAHELIS, N., PAPADAKI, A., PAPANIKOLAOU, S., KOOKOS, I. K., MANDALA, I., KOUTINAS, A. A. Wine lees valorization: Biorefinery development including production of a generic fermentation feedstock employed for poly (3-hydroxybutyrate) synthesis. **Food Research International**, v. 73, p. 81-87, 2015.

DONG, X., ZHU, C. P., HUANG, G. Q., XIAO, J. X. Fractionation and structural characterization of polysaccharides derived from red grape pomace. **Process Biochemistry**, v. 109, p. 37-45, 2021.

DROSOU, C., KYRIAKOPOULOU, K., BIMPILAS, A., TSIMOGIANNIS, D., KROKIDA, M. A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. **Industrial Crops and Products**, v. 75, p. 141-149, 2015.

Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri). Produção de uvas e vinhos em Santa Catarina. Disponível em: <https://www.epagri.sc.gov.br>. Acesso em: 24 fev. 2024.

FANG, J. Bioavailability of anthocyanins. **Drug Metabolism Reviews**, v. 46, n. 4, p. 508-520, 2014.

FELLOWS, P. J. Tecnologia do Processamento de Alimentos-: Princípios e Prática. **Artmed Editora**, 2018.

FERRÃO, L. L., SILVA, E. B., SILVA, H. L. A., SILVA, R., MOLLAKHALILI, N., GRANATO, D., ... CRUZ, A. G. Strategies to develop healthier processed cheeses: Reduction of sodium and fat contents and use of prebiotics. **Food Research International**, v. 86, p. 93-102, 2016.

FERREIRA, L. F., MINUZZI, N. M., RODRIGUES, R. F., PAULETTO, R., RODRIGUES, E., EMANUELLI, T., BOCHI, V. C. Citric acid water-based solution for blueberry bagasse anthocyanins recovery: Optimization and comparisons with microwave-assisted extraction (MAE). **LWT**, v. 133, p. 110064, 2020.

FIDELIS, M., DO CARMO, M. A. V., AZEVEDO, L., CRUZ, T. M., MARQUES, M. B., MYODA, T., ... GRANATO, D. Response surface optimization of phenolic compounds from jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* [Mart.] O. Berg) seeds: Antioxidant, antimicrobial, antihyperglycemic, antihypertensive and cytotoxic assessments. **Food and Chemical Toxicology**, v. 142, p. 111439, 2020.

FLAMINI, R. MATTIVI, F., DE ROSSO, M., ARAPITSAS, P., BAVARESCO, L. Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 10, p. 19651-19669, 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). *Wine production statistics*. 2021. Disponível em: <https://www.fao.org>. Acesso em: 20 fev. 2024.

FOSSEN, TORGILS; CABRITA, LUIS; ANDERSEN, OYVIND M. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. **Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 435-440, 1998.

FREITAS, L., DARIVA, C., JACQUES, R. A., CARAMÃO, E. B. Effect of experimental parameters in the pressurized liquid extraction of brazilian grape seed oil. **Separation and Purification Technology**, v. 116, p. 313-318, 2013.

FRESHNEY, R. I. Culture of specific cell types. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**, 2005.

GALANAKIS, C. M. Emerging technologies for the production of nutraceuticals from agricultural by-products: a viewpoint of opportunities and challenges. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 4, p. 575-579, 2013.

GAMAGE, G. C. V.; GOH, J. K.; CHOO, W. S. Application of anthocyanins from black goji berry in fermented dairy model food systems: An alternate natural purple color. **LWT**, v. 115975, 2024.

GAO, B., WANG, J., WANG, Y., XU, Z., LI, B., MENG, X., ... ZHU, J. Influence of fermentation by lactic acid bacteria and in vitro digestion on the biotransformations of blueberry juice phenolics. **Food Control**, v. 133, p. 108603, 2022.

GARCIA-CASTELLO, E. M., CONIDI, C., CASSANO, A. A membrane-assisted green strategy for purifying bioactive compounds from extracted white wine lees. **Separation and Purification Technology**, v. 336, p. 126183, 2024.

GARCIA-JARES, C., VAZQUEZ, A., LAMAS, J. P., PAJARO, M., ALVAREZ-CASAS, M., LORES, M. Antioxidant white grape seed phenolics: pressurized liquid extracts from different varieties. **Antioxidants**, v. 4, n. 4, p. 737-749, 2015.

GASÍŃSKI, A., KAWA-RYGIELSKA, J., MIKULSKI, D., KŁOSOWSKI, G., GŁOWACKI, A. Application of white grape pomace in the brewing technology and its impact on the concentration of esters and alcohols, physicochemical parameters and antioxidative properties of the beer. *Food chemistry*, v. 367, p. 130646, 2022.

GEANKOPLIS, C. J. Drying of process materials. **Transport processes and unit operations**, p. 520-583, 1993.

GIACOBBO, A., BERNARDES, A. M., DE PINHO, M. N. Sequential pressure-driven membrane operations to recover and fractionate polyphenols and polysaccharides from second racking wine lees. **Separation and Purification Technology**, v. 173, p. 49-54, 2017.

GIACOBBO, A., DO PRADO, J. M., MENEGUZZI, A., BERNARDES, A. M., DE PINHO, M. N. Microfiltration for the recovery of polyphenols from winery effluents. *Separation and Purification Technology*, v. 143, p. 12-18, 2015. JARA-PALACIOS, M. J. Wine lees as a source of antioxidant compounds. **Antioxidants**, v. 8, n. 2, p. 45, 2019.

GIOVANNINI, E.; MANFROI, E. *Viticultura e Enologia: elaboração de grandes vinhos nos terroirs brasileiros*. Bento Gonçalves: IFRS, 2009. 344 p.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, p. 1-13, 2001.

GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E. Anthocyanins: characterization and measurement with UV-visible spectroscopy, F1.2.1-13. In: Wrolstad, R.E. Current protocols in food analytical chemistry. New York: **John Wiley and Sons Inc.**, 2001.

GLÓRIA, M.M.; REGITANO-d' ARCE, M.A.B. Concentrado e isolado proteico de tortade castanha do Pará: obtenção e caracterização química e funcional. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, p. 1-8, 2000.

GLORIES, Y. La couleur des vins rouges. **Conn. Vigne Vin**, v. 18, n. 4, p. 253-271, 1984.

GONZÁLEZ, M., BARRIOS, S., BUDELLI, E., PÉREZ, N., LEMA, P., HEINZEN, H. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds in fresh and freeze-dried *Vitis vinifera* cv Tannat grape pomace. **Food and Bioproducts Processing**, v. 124, p. 378- 386, 2020.

GOULA, A. M., THYMIATIS, K., KADERIDES, K. Valorization of grape pomace: Drying behavior and ultrasound extraction of phenolics. **Food and Bioproducts Processing**, v. 100, p. 132-144, 2016.

GRANADO-LORENCIO, F., HERRERO-BARBUDO, C., BLANCO-NAVARRO, I., PÉREZ-SACRISTÁN, B., OLMEDILLA-ALONSO, B. Bioavailability of carotenoids and α -tocopherol from fruit juices in the presence of absorption modifiers: in vitro and in vivo assessment. **British Journal of Nutrition**, v. 101, n. 4, p. 576-582, 2008.

GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E. P., AMBRIZ-PÉRE, D. L., LEYVA-LÓPEZ, N., CASTILLO-LÓPEZ, R. I., HEREDIA, J. B. Dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility. **Archivos latinoamericanos de nutrición**, v. 66, n. 2, p. 87-100, 2016.

HAAS, I. C. D. S., TOALDO, I. M., MÜLLER, C. M. O., BORDIGNON-LUIZ, M. T. Modeling of drying kinetics of the non-pomace residue of red grape (*V. labrusca* L.) juices: Effect on the microstructure and bioactive anthocyanins. **Journal of Food Process Engineering**, v. 40, n. 6, p. e12568, 2017.

HAAS, I. C., DE ESPINDOLA, J. S., DE LIZ, G. R., LUNA, A. S., BORDIGNON-LUIZ, M. T., PRUDÊNCIO, E. S., ... FEDRIGO, I. M. T. Gravitational assisted three-stage block freeze concentration process for producing enriched concentrated orange juice (*Citrus sinensis* L.): Multi-elemental profiling and polyphenolic bioactives. **Journal of Food Engineering**, v. 315, p. 110802, 2022.

HAAS, I. C., MARMITT, D. J., FEDRIGO, I. M. T., GOETTERT, M. I., BORDIGNON-LUIZ, M. T. Evaluation of antiproliferative and anti-inflammatory effects of non-pomace sediment of red grape juices (*Vitis labrusca* L.) in healthy and cancer cells after in vitro gastrointestinal simulation. **Pharma Nutrition**, v. 13, p. 100204, 2020.

HAAS, I. C.; TOALDO, I. M.; GOMES, T. M.; LUNA, A. S.; DE GOIS, J. S.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Polyphenolic profile, macro-and microelements in bioaccessible fractions of grape juice sediment using in vitro gastrointestinal simulation. **Food Bioscience**, v. 27, p. 66-74, 2019.

HALEE, A.; SUPAVITITPATANA, P.; RUTTARATTANAMONGKOL, K.; JITTREPOTCH, N.; ROJSUNTORNKITTI, K.; KONGBANGKERD, T. Optimisation of the microwave assisted extraction of natural antioxidants from defatted black rice bran of *oryza sativa* l. cv. homnin. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 9, n. 6, p. 1134-1140, 2020.

HAMZA, A. A., HEEBA, G. H., ELWY, H. M., MURALI, C., EL-AWADY, R., AMIN, A. Molecular characterization of the grape seeds extract's effect against chemically induced liver cancer: In vivo and in vitro analyses. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2018.

HARTEL, R. W.; CHUNG, M. S. Contact nucleation of ice in fluid dairy products.

Journal of food engineering, v. 18, n. 3, p. 281-296, 1993.

HE, J., GIUSTI, M. M. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. **Annual review of food science and technology**, v. 1, n. 1, p. 163-187, 2010.

HELDMAN, D. R.; LUND, D. B.; SABLIOV, C. (Ed.). **Handbook of food engineering**. CRC press, 2018.

HENG, M. Y., TAN, S. N., YONG, J. W. H., ONG, E. S. Emerging green technologies for the chemical standardization of botanicals and herbal preparations. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 1-10, 2013.

HUR, S. J., LIM, B. O., DECKER, E. A., MCCLEMENTS, D. J. In vitro human digestion models for food applications. **Food chemistry**, v. 125, n. 1, p. 1-12, 2011.

IDHAM, Z.; PUTRA, N. R.; AZIZ, A. H. A.; ZAINI, A. S.; RASIDEK, N. A. M.; MILI, N.; YUNUS, M. A. C. Improvement of extraction and stability of anthocyanins, the natural red pigment from roselle calyces using supercritical carbon dioxide extraction. **Journal of CO₂ Utilization**, v. 56, p. 101839, 2022.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Produção de uvas no Brasil. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/uva/br>. Acesso em: 24 fev. 2024.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-5: 2009-Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, 2009.

JACKSON, R. S. **Wine science: Principles and applications**. 3rd. ed. London: Academic Press, 2008, 789p.

JACKSON, R. S. Wine, food, and health. **Wine Science**, p. 947, 2020.

JAMAR, G.; ESTADELLA, D.; PISANI, L. P. Contribution of anthocyanin-rich foods in obesity control through gut microbiota interactions. **BioFactors**, v. 43, n. 4, p. 507-516, 2017.

JARA-PALACIOS, M. J. Wine lees as a source of antioxidant compounds. **Antioxidants**, v. 8, n. 2, p. 45, 2019.

JAYAPRAKASHA, G. K., SINGH, R. P., SAKARIAH, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. **Food Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 285-290, 2001.

JOHN, M., SEMKEN, R. S., MIKKOLA, A., HÄKKINEN, A. Natural freeze concentration of wastewater for nutrient recovery. **Cold Regions Science and Technology**, v. 213, p. 103943, 2023.

JU, Z. Y.; HOWARD, L. R. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5207-5213, 2003.

KALLITHRAKA, S., GARCIA-VIGUERA, C., BRIDLE, P., BAKKER, J. Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics. **Phytochemical Analysis**, v. 6, n. 5, p.265-267, 1995.

KHOO, H. E.; NG, H. S.; YAP, W. S.; GOH, H. J. H.; YIM, H. S. Nutrients for prevention of macular degeneration and eye-related diseases. **Antioxidants**, v. 8, n. 4, p. 85, 2019.

KONTOGIANNOPOULOS, K. N., PATSIOS, S. I., KARABELAS, A. J. Tartaric acid recovery from winery lees using cation exchange resin: Optimization by Response Surface Methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 165, p. 32-41, 2016.

KOPSAHELIS, N., DIMOU, C., PAPADAKI, A., XENOPOULOS, E., KYRALEOU, M., KALLITHRAKA, S., KOUTINAS, A. A. Refining of wine lees and cheese whey for the production of microbial oil, polyphenol-rich extracts and value-added co-products. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 257-268, 2018.

KUETE, V., MBAVENG, A. T., NONO, E. C., SIMO, C. C., ZEINO, M., NKENGFACK, A. E., EFFERTH, T. Cytotoxicity of seven naturally occurring phenolic compounds towards multi-factorial drug-resistant cancer cells. **Phytomedicine**, v. 23, n. 8, p. 856-863, 2016.

KUNTZ, S., RUDLOFF, S., ASSEBURG, H., BORSCH, C., FRÖHLING, B., UNGER, F., ... KUNZ, C. Uptake and bioavailability of anthocyanins and phenolic acids from grape/blueberry juice and smoothie in vitro and in vivo. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. 7, p. 1044-1055, 2015.

LANDEKA, I.; DORA, M.; GUBEROVIĆ, I.; PETRAS, M.; RIMAC, S.; ĐIKIĆ, D. Polyphenols from wine lees as a novel functional bioactive compound in the protection against oxidative stress and hyperlipidaemia. **Food Technology and Biotechnology**, v. 55, n. 1, p. 109, 2017.

LASTA, H. F. B.; LENTZ, L.; RODRIGUES, L. G. G.; MEZZOMO, N.; VITALI, L.; FERREIRA, S. R. S. Pressurized liquid extraction applied for the recovery of phenolic compounds from beetroot waste. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, p. 101353, 2019.

LAYA, A., KOUBALA, B. B. Polyphenols in cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz) and their stability in antioxidant potential after in vitro gastrointestinal digestion. **Heliyon**, v. 6, n. 3, 2020.

LEONARSKI, E.; KUASNEI, M.; MORAES, P. A. D.; CESCO, K.; DE OLIVEIRA, D.; ZIELINSKI, A. A. F. Pressurized liquid extraction as an eco-friendly approach to recover anthocyanin from black rice bran. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 86, p. 103372, 2023.

LI, D., WANG, P., LUO, Y., ZHAO, M., CHEN, F. Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: Update from recent decade. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 8, p. 1729-1741, 2017.

LIU, Y., LIU, Y., TAO, C., LIU, M., PAN, Y., LV, Z. Effect of temperature and pH on stability of anthocyanin obtained from blueberry. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, p. 1744-1753, 2018.

LOARCE, L., OLIVER-SIMANCAS, R., MARCHANTE, L., DÍAZ-MAROTO, M. C., ALAÑÓN, M. E. Modifiers based on natural deep eutectic mixtures to enhance anthocyanins isolation from grape pomace by pressurized hot water extraction. **LWT**, v.149, p. 111889, 2021.

LOPEZ-CORONA, A. V.; VALENCIA-ESPINOSA, I.; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, F. A.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, A. L.; GARCIA-AMEZQUITA, L. E.; GARCIA-VARELA, R. Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of phenolic compound family extracted from raspberries (*Rubus idaeus*): A general review. **Antioxidants**, v. 11, n. 6, p. 1192, 2022.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ-SOBRINO, R., SOLIZ-RUEDA, J. R., MARGALEF, M., AROLA-ARNAL, A., SUÁREZ, M., BRAVO, F. I., MUGUERZA, B. ACE Inhibitory and antihypertensive activities of wine lees and relationship among bioactivity and phenolic profile. **Nutrients**, v. 13, n. 2, p. 679, 2021.

LUZARDO-OCAMPO, I.; RAMÍREZ-JIMÉNEZ, A. K.; YAÑEZ, J.; MOJICA, L.; LUNA-VITAL, D. A. Technological applications of natural colorants in food systems: A review. **Foods**, v. 10, n. 3, p. 634, 2021.

MACHADO, A. P. D. F., PASQUEL-REÁTEGUI, J. L., BARBERO, G. F., MARTÍNEZ, J. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. **Food Research International**, v. 77, p. 675-683, 2015.

MACIEL-SILVA, F. W., VIGANÓ, J., CASTRO, L. E., SGANZERLA, W. G., BULLER, L. S., MARTÍNEZ, J., ...FORSTER-CARNEIRO, T. Pressurized liquid extraction coupled in-line with SPE and on-line with HPLC (PLE-SPExHPLC) for the recovery and purification of anthocyanins from SC-CO₂ semi-defatted Açaí (*Euterpe oleracea*). **Food Research International**, v. 160, p. 111711, 2022.

MAHAYOTHEE, B., KOMONSING, N., KHUWIJITJARU, P., NAGLE, M., MÜLLER, J. Influence of drying conditions on colour, betacyanin content and antioxidant capacities in dried red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 2, p. 460-470, 2019.

MAICAS, S.; MATEO, J. J. Sustainability of wine production. **Sustainability**, v. 12, n. 2, p. 559, 2020.

MANER, S., SHARMA, A. K., BANERJEE, K. Wheat flour replacement by wine grape pomace powder positively affects physical, functional and sensory properties of cookies. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 87, p. 109-113, 2017.

MARCOS, J., CARRIÇO, R., SOUSA, M. J., PALMA, M. L., PEREIRA, P., NUNES, M. C., NICOLAI, M. Effect of Grape Pomace Flour in Savory Crackers: Technological, Nutritional and Sensory Properties. **Foods**, v. 12, n. 7, p. 1392, 2023.

MARIANI, A.; VASTOLA, A. Sustainable winegrowing: Current perspectives. **International Journal of Wine Research**, p. 37-48, 2015.

MARTINS, I. M., MACEDO, G. A., MACEDO, J. A. Biotransformed grape pomace as a potential source of anti-inflammatory polyphenolics: Effects in Caco-2 cells. *Food bioscience*, v. 35, p. 100607, 2020.

MATOS, M. S., ROMERO-DÍEZ, R., ÁLVAREZ, A., BRONZE, M. R., RODRÍGUEZ-ROJO, S., MATO, R. B., MATIAS, A. A. Polyphenol-rich extracts obtained from winemaking waste streams as natural ingredients with cosmeceutical potential. **Antioxidants**, v. 8, n. 9, p. 355, 2019.

MATSUMOTO, H.; NAKAMURA, Y.; IIDA, H.; ITO, K.; OHGURO, H. Comparative assessment of distribution of blackcurrant anthocyanins in rabbit and rat ocular tissues. **Experimental Eye Research**, v. 83, n. 2, p. 348-356, 2006.

MATTIOLI, R.; FRANCIOSO, A.; MOSCA, L.; SILVA, P. Anthocyanins: A comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 3809, 2020.

MAZZUTTI, S.; RODRIGUES, L. G. G.; MEZZOMO, N.; VENTURI, V.; FERREIRA, S. R. S. Integrated green-based processes using supercritical CO₂ and pressurized ethanol applied to recover antioxidant compounds from cocoa (*Theobroma cacao*) bean hulls. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 135, p. 52-59, 2018.

MCGHIE, T. K.; WALTON, M. C. The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, n. 6, p. 702-713, 2007.

MEHRA, R.; KUMAR, H.; RAFIQ, S.; KUMAR, N.; BUTTAR, H. S.; LEICHT, K.; KORZENIOWSKA, M. Enhancing yogurt products' ingredients: preservation strategies, processing conditions, analytical detection methods, and therapeutic delivery—an overview. **PeerJ**, v. 10, p. e14177, 2022.

MEINI, M. R., CABEZUDO, I., GALETTO, C. S., ROMANINI, D. Production of grape pomace extracts with enhanced antioxidant and prebiotic activities through solid-state fermentation by *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. *Food Bioscience*, v. 42, p. 101168, 2021.

MEJICA, G. F. C., UNPAPROM, Y., BALAKRISHNAN, D., DUSSADEE, N., BUOCHAREON, S., RAMARAJ, R. Anthocyanin pigment-based dye-sensitized solar cells with improved pH-dependent photovoltaic properties. **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, v. 51, p. 101971, 2022.

MELGAR AGUILAR, A. E.; FAGUNDES, A. P.; PIER MACUVELE, D. L.; CESCA, K.; PORTO, L.; PADOIN, N.; RIELLA, H. G. Green Synthesis of Nano Hydroxyapatite: morphology variation and its effect on cytotoxicity against fibroblast. **Materials Letters**, v. 284, 2021.

MENESES, D. L., RUIZ, Y., HERNANDEZ, E., MORENO, F. L. Multi-stage block freeze-concentration of green tea (*Camellia sinensis*) extract. **Journal of Food Engineering**, v. 293, p. 110381, 2021.

MIDILLI, A. Determination of pistachio drying behavior and conditions in a solar drying system. **International Journal Energy Research**, v. 25, p. 715–725, 2001.

MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; BALLANCE, S.; BOHN, T.; BOURLIEU, C.; BRODKORB, A. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. **Food & Function**, v. 5, n. 6, p. 1113-1124, 2014.

MIRABELLA, N., CASTELLANI, V., SALA, S. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 65, p. 28-41, 2014.

MIR-CERDÀ, A., CARRETERO, I., COVES, J. R., PEDROUSO, A., CASTRO- BARROS, C. M., ALVARINO, T., SENTELLAS, S. Recovery of phenolic compounds from wine lees using green processing: Identifying target molecules and assessing membrane ultrafiltration performance. **Science of The Total Environment**, v. 857, p. 159623, 2023.

MIYAWAKI, O., KATO, S., WATABE, K. Yield improvement in progressive freeze-concentration by partial melting of ice. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 3, p. 377-382, 2012.

MORENO, F. L., RAVENTÓS, M., HERNÁNDEZ, E., RUIZ, Y. Block freeze-concentration of coffee extract: Effect of freezing and thawing stages on solute recovery and bioactive compounds. **Journal of Food Engineering**, v. 120, p. 158-166, 2014.

MORISON K. R., HARTEL, R. W. Evaporation and freeze concentration. In: Handbook of food engineering. **CRC Press**, 2018. p. 705-764.

MORO, K. I. B., BENDER, A. B. B., DA SILVA, L. P., PENNA, N. G. Green extraction methods and microencapsulation technologies of phenolic compounds from grape pomace: A review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 14, p. 1407-1431, 2021.

MUELLER, D., JUNG, K., WINTER, M., ROGOLL, D., MELCHER, R., KULOZIK, U., ... RICHLING, E. Encapsulation of anthocyanins from bilberries—Effects on bioavailability and intestinal accessibility in humans. **Food Chemistry**, v. 248, p. 217-224, 2018.

MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 703, n. 1, p. 8-18, 2011.

NASCIMENTO, A. L. A. A., BORGES, L. L. R., FERNANDES, J. G., FREITAS, V. V., MARTINS, E., CAMPELO, P. H., STRINGHETA, P. C. Exploring strategies to enhance anthocyanin bioavailability and bioaccessibility in food: A literature review. **Food Bioscience**, p. 103388, 2023.

NETO, J. J. L., DE ALMEIDA, T. S., DE MEDEIROS, J. L., VIEIRA, L. R., MOREIRA, T. B., MAIA, A. I. V., ...CARVALHO, A. F. U. Impact of bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in biological systems upon the antioxidant activity of the ethanolic extract of *Triplaris gardneriana* seeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 999-1007, 2017.

NIETO, A., BORRULL, F., POCURULL, E., MARCÉ, R. M. Pressurized liquid extraction: A useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 752-764, 2010.

OLIVEIRA, A. L. Green coffee extracts rich in diterpenes–Process optimization of pressurized liquid extraction using ethanol as solvent. **Journal of Food Engineering**, v.224, p. 148-155, 2018.

ONWUDE, D. I., HASHIM, N., JANUS, R. B., NAWI, N., ABDAN, K. Evaluation of a suitable thin layer model for drying of pumpkin under forced air convection. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 3, 2016.

ORELLANA-PALMA, P., GONZÁLEZ, Y., PETZOLD, G. Improvement of centrifugal cryoconcentration by ice recovery applied to orange juice. **Chemical Engineering & Technology**, v. 42, n. 4, p. 925-931, 2019.

ORELLANA-PALMA, P., PETZOLD, G., ANDANA, I., TORRES, N., CUEVAS, C. Retention of ascorbic acid and solid concentration via centrifugal freeze concentration of orange juice. **Journal of Food Quality**, v. 2017, n. 1, p. 5214909, 2017.

ORELLANA-PALMA, P., PETZOLD, G., GUERRA-VALLE, M., ASTUDILLO-LAGOS, M. Impact of block cryoconcentration on polyphenol retention in blueberry juice. **Food Bioscience**, v. 20, p. 149-158, 2019.

ORGANISATION INTERNATIONALE DE LA VIGNE ET DU VIN (OIV). Estatísticas de produção de vinho em 2023. Disponível em: <https://www.oiv.int>. Acesso em: 26 fev. 2024.

ORGANISATION INTERNATIONALE DE LA VIGNE ET DU VIN (OIV). OIV Guide for the Implementation of Principles of Sustainable Vitiviniculture. 2020. Disponível em: <https://www.oiv.int/standards/oiv-guide-for-the-implementation-of-principles-of-sustainable-vitiviniculture>. Acesso em: 24 fev. 2024.

ORTEGA, N.; MACIÀ, A.; ROMERO, M. P.; REGUANT, J.; MOTILVA, M. J. Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an in-vitro digestion model. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 65-71, 2011.

OSORIO, M., MORENO, F. L., HERNÁNDEZ, E., RUIZ-PARDO, R. Y. Impact of falling-film freeze concentration in a commercial L ager beer. **Journal of Food Process Engineering**, v. 46, n. 4, p. e14292, 2023.

OSORIO-TOBÓN, J. F., MEIRELES, M. A. A., OSORIO-TOBÓN, J. F., MEIRELES, M. A. A. Recent applications of pressurized fluid extraction: curcuminoids extraction with pressurized liquids. **Food Public Health**, v. 3, n. 6, p. 289-303, 2013.

OTERO-PAREJA, M. J., CASAS, L., FERNÁNDEZ-PONCE, M. T., MANTELL, C., MARTINEZ DE LA OSSA, E. J. Green extraction of antioxidants from different varieties of red grape pomace. **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 9686-9702, 2015.

OU, S. J. L.; YU, J.; ZHOU, W.; LIU, M. H. Effects of anthocyanins on bread microstructure, and their combined impact on starch digestibility. **Food Chemistry**, v. 374, p. 131744, 2022.

PAGANO, I.; CAMPONE, L.; CELANO, R.; PICCINELLI, A. L.; RASTRELLI, L. Green non-conventional techniques for the extraction of polyphenols from agricultural food by-products: A review. **Journal of Chromatography A**, v. 1651, p. 462295, 2021.

PARK, H., PARK, E. K., CHOI, S., SHIN, H., KIM, M. J., PARK, J. M. Quality Characteristics of Cheongsoo Grape Wine by Freeze Concentration Fermented with Different Yeasts. **The Korean Journal of Food And Nutrition**, v. 33, n. 5, p. 512-523, 2020.

PARK, S.; CHO, S. M.; JIN, B. R.; YANG, H. J.; YI, Q. J. Mixture of blackberry leaf and fruit extracts alleviates non-alcoholic steatosis, enhances intestinal integrity, and increases Lactobacillus and Akkermansia in rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 244, n. 18, p. 1629-1641, 2019.

PAZIR, F., KOÇAK, E., TURAN, F., OVA, G. Extraction of anthocyanins from grape pomace by using supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 8, p. e14950, 2021.

PEDRALI, D., BARBARITO, S., LAVELLI, V. Encapsulation of grape seed phenolics from winemaking byproducts in hydrogel microbeads–Impact of food matrix and processing on the inhibitory activity towards α -glucosidase. **LWT**, v. 133, p. 109952, 2020.

PEREIRA, D. T. V.; TARONE, A. G.; CAZARIN, C. B. B.; BARBERO, G. F.; MARTÍNEZ, J. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from grape marc. **Journal of Food Engineering**, v. 240, p. 105-113, 2019.

PÉREZ-BIBBINS, B.; TORRADO-AGRASAR, A.; SALGADO, J. M.; DE SOUZA OLIVEIRA, R. P.; DOMÍNGUEZ, J. M. Potential of lees from wine, beer and cider manufacturing as a source of economic nutrients: An overview. **Waste Management**, v. 40, p. 72-81, 2015.

PERRA, M., BACCHETTA, G., MUNTONI, A., DE GIOANNIS, G., CASTANGIA, I., RAJHA, H. N., MANCONI, M. An outlook on modern and sustainable approaches to the management of grape pomace by integrating green processes, biotechnologies and advanced biomedical approaches. **Journal of Functional Foods**, v. 98, p. 105276, 2022.

PERRA, M., LEYVA-JIMÉNEZ, F. J., MANCA, M. L., MANCONI, M., RAJHA, H. N., BORRÁS-LINARES, I., ...LOZANO-SÁNCHEZ, J. Application of pressurized liquid extraction to grape by-products as a circular economy model to provide phenolic compounds enriched ingredient. **Journal of Cleaner Production**, v. 402, p. 136712, 2023.

PETRESKA STANOEVA, J., BALSHIKEVSKA, E., STEFOVA, M., TUSEVSKI, O., SIMIC, S. G. Comparison of the effect of acids in solvent mixtures for extraction of phenolic

compounds from *Aronia melanocarpa*. **Natural Product Communications**, v. 15, n. 7, p. 1934578X20934675, 2020.

PETZOLD, G., ORELLANA, P., MORENO, J., CERDA, E., PARRA, P. Vacuum-assisted block freeze concentration applied to wine. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, p. 330-335, 2016.

PETZOLD, G., AGUILERA, J. M. Ice morphology: fundamentals and technological applications in foods. **Food Biophysics**, v. 4, p. 378-396, 2009.

PETZOLD, G., NIRANJAN, K., AGUILERA, J. M. Vacuum-assisted freeze concentration of sucrose solutions. **Journal of Food Engineering**, v. 115, n. 3, p. 357-361, 2013.

PETZOLD, G., ORELLANA, P., MORENO, J., CERDA, E., PARRA, P. Vacuum-assisted block freeze concentration applied to wine. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 36, p. 330-335, 2016.

PINELO, M., RUBILAR, M., JEREZ, M., SINEIRO, J., NÚÑEZ, M. J. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2111-2117, 2005.

PINTER, I. F., FERNÁNDEZ, A. S., MARTÍNEZ, L. E., RIERA, N., FERNÁNDEZ, M., AGUADO, G. D., ULIARTE, E. M. Exhausted grape marc and organic residues composting with polyethylene cover: Process and quality evaluation as plant substrate. **Journal of environmental management**, v. 246, p. 695-705, 2019.

PITZ, H. D. S.; PEREIRA, A.; BLASIUS, M. B.; VOYTENA, A. P. L.; AFFONSO, R. C.; FANAN, S.; MARASCHIN, M. In vitro evaluation of the antioxidant activity and wound healing properties of Jaboticaba (*Plinia peruviana*) fruit peel hydroalcoholic extract. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016.

PULGAR, R., MANDAKOVIC, D., SALGADO, P., VENEGAS, L., ORTIZ, D., PEÑA-NEIRA, Á., WACYK, J. Micro-encapsulated grape pomace extract (MGPE) as a feed additive improves growth performance, antioxidant capacity, and shifts the gut microbiome of rainbow trout. **Aquaculture**, v. 544, p. 737129, 2021.

RACHWAŁ, K.; WAŚKO, A.; GUSTAW, K.; POLAK-BERECKA, M. Utilization of brewery wastes in food industry. **PeerJ**, v. 8, p. e9427, 2020.

RATTI, C. (Ed.). **Advances in food dehydration**. CRC Press, 2008.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

REIS, G. M., FACCIN, H., VIANA, C., ROSA, M. B. D., DE CARVALHO, L. M. Vitis vinifera L. cv Pinot noir pomace and lees as potential sources of bioactive compounds. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 67, n. 7, p. 789-796, 2016.

REVILLA, I.; PÉREZ-MAGARIÑO, S.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L.; BELTRÁN, S. Identification of anthocyanin derivatives in grape skin extracts and red wines by liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 847, n. 1-2, p. 83-90, 1999.

RIBEREAU-GAYON, P.; DOVAZ, M. *Guide pratique du vin*. 2. ed. Paris: Hachette Pratique, 1997.

RÍOS-MORENO, G., CRUZ-REYES, I., VARGAS-RODRÍGUEZ, P., FÉLIX-FLORES, M. G., QUIÑONES-REYES, G., LOZADA-RODRÍGUEZ, L. Mathematical modeling of infrared drying of red pitaya pulp (*Stenocereus queretaroensis*) for potential use of its betalains. **Journal of Food Process Engineering**, v. 45, n. 9, p. e14108, 2022.

RIVAS, M. Á., CASQUETE, R., CÓRDOBA, M. D. G., RUÍZ-MOYANO, S., BENITO, M. J., PÉREZ-NEVADO, F., MARTÍN, A. Chemical composition and functional properties of dietary fibre concentrates from winemaking by-products: skins, stems and lees. **Foods**, v. 10, n. 7, p. 1510, 2021.

RIVERA, O. M. P., LEOS, M. D. S., SOLIS, V. E., DOMÍNGUEZ, J. M. Recent trends on the valorization of winemaking industry wastes. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 27, p. 100415, 2021.

ROCKENBACH, I. I., GONZAGA, L. V., RIZELIO, V. M., GONÇALVES, A. E. D. S. S., GENOVESE, M. I., FETT, R. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 897-901, 2011.

RODRIGUES, L. G. G., MAZZUTTI, S., VITALI, L., MICKE, G. A., FERREIRA, S. R. S. Recovery of bioactive phenolic compounds from papaya seeds agroindustrial residue using subcritical water extraction. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101367, 2019.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E., WROLSTAD, R. E. Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. **Current protocols in food analytical chemistry**, n. 1, p. F1. 1.1-F1. 1.11, 2001.

ROMBAUT, N., SAVOIRE, R., THOMASSET, B., CASTELLO, J., VAN HECKE, E., LANOISELLÉ, J. L. (2015). Optimization of oil yield and oil total phenolic content during grape seed cold screw pressing. **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 26-33, 2015.

ROMERO-DÍEZ, R., MATOS, M., RODRIGUES, L., BRONZE, M. R., RODRÍGUEZ-ROJO, S., COCERO, M. J., MATIAS, A. A. Microwave and ultrasound pre-treatments to enhance anthocyanins extraction from different wine lees. **Food Chemistry**, v. 272, p. 258-266, 2019.

ROMERO-DÍEZ, R., RODRÍGUEZ-ROJO, S., COCERO, M. J., DUARTE, C. M., MATIAS, A. A., BRONZE, M. R. Phenolic characterization of aging wine lees: Correlation with antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 259, p. 188-195, 2018.

SAMOTA, M. K., SHARMA, M., KAUR, K., SARITA, YADAV, D. K., PANDEY, A. K., ... RANI, H. Onion anthocyanins: Extraction, stability, bioavailability, dietary effect, and health implications. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 917617, 2022.

SAMSURI, S., LI, T. H., RUSLAN, M. S. H., AMRAN, N. A. Antioxidant recovery from pomegranate peel waste by integrating maceration and freeze concentration technology. **International Journal of Food Engineering**, v. 16, n. 10, p. 20190232, 2020.

SÁNCHEZ, J., HERNÁNDEZ, E., AULEDA, J. M., RAVENTÓS, M. Freeze concentration of whey in a falling-film based pilot plant: Process and characterization. **Journal of Food Engineering**, v. 103, n. 2, p. 147-155, 2011.

SÁNCHEZ, J., RUIZ, Y., AULEDA, J. M., HERNÁNDEZ, E., RAVENTÓS, M. Freeze concentration in the fruit juices industry. **Food Science and Technology International**, v. 15, n. 4, p. 303-315, 2009.

SÁNCHEZ-PONCE, L., GRANADO-CASTRO, M. D., CASANUEVA-MARENCO, M. J., GALINDO-RIÑO, M. D., DÍAZ-DE-ALBA, M. Sherry wine industry by-product as potential biosorbent for the removal of Cr (VI) from aqueous medium. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-19, 2021.

SANCHO-GALÁN, P., AMORES-ARROCHA, A., JIMÉNEZ-CANTIZANO, A., PALACIOS, V. Physicochemical and nutritional characterization of winemaking lees: A new food ingredient. **Agronomy**, v. 10, n. 7, p. 996, 2020.

SANTOS K. S., BARBOSA, A. M., FREITAS, V., MUNIZ, A. V. C., MENDONÇA, M. C., CALHELHA, R. C., DARIVA, C. Antiproliferative activity of neem leaf extracts obtained by a sequential pressurized liquid extraction. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 3, p. 76, 2018.

SANTOS, D. T., VEGGI, P. C., MEIRELES, M. A. A. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 3, p. 444-452, 2012.

SECRETARIAT VITI, OIV. *Managing By-Products of Vitivinicultural Origin*. OIV Collective Expertise, 1^a ed. Paris: OIV, 2018. Disponível em: <https://www.oiv.int/standards/oiv-guide-for-the-implementation-of-principles-of-sustainable-viticulture>. Acesso em: 18 jan. 2024.

SENGUL, H., SUREK, E., NILUFER-ERDIL, D. Investigating the effects of food matrix and food components on bioaccessibility of pomegranate (*Punica granatum*) phenolics and anthocyanins using an in-vitro gastrointestinal digestion model. **Food Research International**, v. 62, p. 1069-1079, 2014.

SHAHIDI, F.; PENG, H. Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. **Journal of Food Bioactives**, v. 4, p. 11-68, 2018.

SHARMA, A. K., AGLAWE, M. K. Addition of processed fine wine lees of cabernet sauvignon to improve nutraceutical properties of yoghurt. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 92, n. 1, p. 141-147, 2022.

SHI, J., NAWAZ, H., POHORLY, J., MITTAL, G., KAKUDA, Y., JIANG, Y. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods—Engineering and technology. **Food Reviews International**, v. 21, n. 1, p. 139-166, 2005.

SIGURDSON, G. T.; TANG, P.; GIUSTI, M. M. Natural colorants: Food colorants from natural sources. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 8, p. 261-280, 2017.

SIMÃO, R., DE MORAES, J. O., MONTEIRO, R. L., SCHAIDT, A. L., CARCIOFI, B. A. M., LAURINDO, J. B. Conductive drying methods for producing high-quality restructured pineapple-starch snacks. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 70, p. 102701, 2021.

SINGLETON, V. L., ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SIROHI, R., TARAFDAR, A., SINGH, S., NEGI, T., GAUR, V. K., GNANSOUNOU, E., BHARATHIRAJA, B. Green processing and biotechnological potential of grape pomace: Current trends and opportunities for sustainable biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 314, p. 123771, 2020.

SONI, P., GHUFRAN, M. S., DUDDUKURI, G. R. Anticancer Potential of Plant-Derived Compounds: An Overview of Their Epigenetic Mode of Action. **Bioprospecting of Tropical Medicinal Plants**, p. 1135-1175, 2023.

SOUSA, E. C., UCHÔA-THOMAZ, A. M. A., CARIOCA, J. O. B., MORAIS, S. M. D., LIMA, A. D., MARTINS, C. G., RODRIGUES, L. L. Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (*Vitis vinifera* L.), Benitaka variety, grown in the semiarid region of Northeast Brazil. **Food Science and Technology**, v. 34, p. 135-142, 2014.

SPIGNO, G., DONSI, F., AMENDOLA, D., SESSA, M., FERRARI, G., DE FAVERI, D. M. Nanoencapsulation systems to improve solubility and antioxidant efficiency of a grape marc extract into hazelnut paste. **Journal of Food Engineering**, v. 114, n. 2, p. 207-214, 2013.

SPIGNO, G., TRAMELLI, L., DE FAVERI, D. M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of food engineering**, v. 81, n. 1, p. 200-208, 2007.

STAVIKOVA, L.; POLOVKA, M.; HOHNOVÁ, B.; KARÁSEK, P.; ROTH, M. Antioxidant activity of grape skin aqueous extracts from pressurized hot water extraction combined with electron paramagnetic resonance spectroscopy. **Talanta**, v. 85, n. 4, p. 2233-2240, 2011.

STRATI, I. F.; OREOPOULOU, V. Effect of extraction parameters on the carotenoid recovery from tomato waste. **International journal of food science and technology**, v. 46, n. 1, p. 23-29, 2011.

SUN, PINTO, T., LEANDRO, M. C., RICARDO-DA-SILVA, J. M., SPRANGER, M. I. Transfer of catechins and proanthocyanidins from solid parts of the grape cluster into wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, n. 2, p. 179-184, 1999.

TAATJES, D. J., SOBEL, B. E., BUDD, R. C. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. **Histochemistry and cell biology**, v. 129, p. 33-43, 2008.

TAGDE, P.; TAGDE, P.; TAGDE, S.; BHATTACHARYA, T.; GARG, V.; AKTER, R.; ABDEL-DAIM, M. M. Natural bioactive molecules: An alternative approach to the treatment and control of glioblastoma multiforme. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 141, p. 111928, 2021.

TAO, X.; CHEN, C.; LI, Y.; QIN, X.; ZHANG, H.; HU, Y.; LIU, G. Improving the physicochemical stability of Pickering emulsion stabilized by glycosylated whey protein isolate/cyanidin-3-glucoside to deliver curcumin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 229, p. 1-10, 2023.

TARONE, A. G.; CAZARIN, C. B. B.; JUNIOR, M. R. M. Anthocyanins: New techniques and challenges in microencapsulation. **Food Research International**, v. 133, p. 109092, 2020.

TEIXEIRA, A., BAENAS, N., DOMINGUEZ-PERLES, R., BARROS, A., ROSA, E., MORENO, D.A., GARCIA-VIGUERA, C. Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 9, p. 15638-15678, 2014.

TEIXEIRA, R. F., BENVENUTTI, L., BURIN, V. M., GOMES, T. M., FERREIRA, S. R. S., ZIELINSKI, A. A. F. An eco-friendly pressure liquid extraction method to recover anthocyanins from broken black bean hulls. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 67, p. 102587, 2021.

TENA, N.; MARTÍN, J.; ASUERO, A. G. State of the art of anthocyanins: Antioxidant activity, sources, bioavailability, and therapeutic effect in human health. **Antioxidants**, v. 9, n. 5, p. 451, 2020.

TOALDO, I. M., VAN CAMP, J., GONZALES, G. B., KAMILOGLU, S., BORDIGNON-LUIZ, M. T., SMAGGHE, G., ... GROOTAERT, C. Resveratrol improves TNF- α -induced endothelial dysfunction in a coculture model of a Caco-2 with an endothelial cell line. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 36, p. 21-30, 2016.

TOĞRUL, İ. T. Modelling of heat and moisture transport during drying black grapes. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, n. 6, p. 1146-1152, 2010.

TOSTI, V.; BERTOZZI, B.; FONTANA, L. Health benefits of the Mediterranean diet: metabolic and molecular mechanisms. **The Journals of Gerontology: Series A**, v. 73, n. 3, p. 318-326, 2018.

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

TSAKONA, S., GALANAKIS, C. M., GEKAS, V. Hydro-ethanolic mixtures for the recovery of phenols from Mediterranean plant materials. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 1384-1393, 2012.

TSENG, A.; ZHAO, Y. Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 356-365, 2012.

UMSZA-GUEZ, M. A.; VÁZQUEZ-ESPINOSA, M.; CHINCHILLA, N.; ALIAÑO-GONZÁLEZ, M. J.; OLIVEIRA DE SOUZA, C.; AYENA, K.; CARRERA, C. Enhancing Anthocyanin Extraction from Wine Lees: A Comprehensive Ultrasound-Assisted Optimization Study. **Antioxidants**, v. 12, n. 12, p. 2074, 2023.

VERGARA-SALINAS, J. R.; BULNES, P.; ZÚÑIGA, M. C.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; TORRES, J. L.; MATEOS-MARTÍN, M. L.; PÉREZ-CORREA, J. R. Effect of pressurized hot water extraction on antioxidants from grape pomace before and after enological fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 28, p. 6929-6936, 2013.

VERGARA-SALINAS, J. R.; VERGARA, M.; ALTAMIRANO, C.; GONZALEZ, Á.; PÉREZ-CORREA, J. R. Characterization of pressurized hot water extracts of grape pomace: Chemical and biological antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 171, p. 62-69, 2015.

VICTORIA-CAMPOS, C. I., DE JESÚS ORNELAS-PAZ, J., ROCHA-GUZMÁN, N. E., GALLEGOS-INFANTE, J. A., FAILLA, M. L., PÉREZ-MARTÍNEZ, J. D., ... IBARRA-JUNQUERA, V. Gastrointestinal metabolism and bioaccessibility of selected anthocyanins isolated from commonly consumed fruits. **Food Chemistry**, v. 383, p. 132451, 2022.

VIEIRA, V., PRIETO, M. A., BARROS, L., COUTINHO, J. A., FERREIRA, I. C., FERREIRA, O. Enhanced extraction of phenolic compounds using choline chloride based deep eutectic solvents from *Juglans regia* L. **Industrial Crops and Products**, v. 115, p. 261-271, 2017.

VIGANO, J., DE AGUIAR, A. C., VEGGI, P. C., SANCHES, V. L., ROSTAGNO, M. A., MARTINEZ, J. Techno-economic evaluation for recovering phenolic compounds from acai (*Euterpe oleracea*) by-product by pressurized liquid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 179, p. 105413, 2022.

WANG, E.; LIU, Y.; XU, C.; LIU, J. Antiproliferative and proapoptotic activities of anthocyanin and anthocyanidin extracts from blueberry fruits on B16-F10 melanoma cells. **Food & Nutrition Research**, 2017.

WEI, R. et al. Natural and sustainable wine: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, n. 26, p. 8249-8260, 2023.

WIANOWSKA, D.; GIL, M. Critical approach to PLE technique application in the analysis of secondary metabolites in plants. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 114, p. 314-325, 2019.

WU, J. J., LIN, J. C., WANG, C. H., JONG, T. T., YANG, H. L., HSU, S. L., CHIEH-MING, J. C. Extraction of antioxidative compounds from wine lees using supercritical fluids and associated anti-tyrosinase activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 50, n. 1, p. 33-41, 2009.

XIE, X.; ZHAO, R.; SHEN, G. X. Influence of delphinidin-3-glucoside on oxidized low-density lipoprotein-induced oxidative stress and apoptosis in cultured endothelial cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 7, p. 1850-1856, 2012.

YODA, T., MIYAKI, H., SAITO, T. Freeze concentrated apple juice maintains its flavor. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 12679, 2021.

YOUSUF, B.; GUL, K.; WANI, A. A.; SINGH, P. Health benefits of anthocyanins and their encapsulation for potential use in food systems: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 13, p. 2223-2230, 2016.

YU, J.; AHMEDNA, M. Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 48, n. 2, p. 221-237, 2013.

YUSTE, S., LUDWIG, I. A., RUBIÓ, L., ROMERO, M. P., PEDRET, A., VALLS, R. M., ... MACIÀ, A. In vivo biotransformation of (poly) phenols and anthocyanins of red-fleshed apple and identification of intake biomarkers. **Journal of Functional Foods**, v. 55, p. 146-155, 2019.

ZACHAROF, M. P. Grape winery waste as feedstock for bioconversions: applying the biorefinery concept. **Waste and biomass valorization**, v. 8, n. 4, p. 1011-1025, 2017.

ZHANG, H., CHEN, J., LI, J., YAN, L., LI, S., YE, X., ...CHEN, S. Extraction and characterization of RG-I enriched pectic polysaccharides from mandarin citrus peel. **Food Hydrocolloids**, v. 79, p. 579-586, 2018.

ZHAO, Y., WANG, H. P., HAN, B., YU, X. Coupling of abiotic stresses and phytohormones for the production of lipids and high-value by-products by microalgae: A review. **Bioresource Technology**, v. 274, p. 549-556, 2018.

ZIELINSKI, A. A., ZARDO, D. M., ALBERTI, A., BORTOLINI, D. G., BENVENUTTI, L., DEMIATE, I. M., NOGUEIRA, A. Effect of cryoconcentration process on phenolic compounds and antioxidant activity in apple juice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 6, p. 2786-2792, 2019.

ZIELINSKI, A. A., ZARDO, D. M., ALBERTI, A., BORTOLINI, D. G., BENVENUTTI, L., DEMIATE, I. M., NOGUEIRA, A. Effect of cryoconcentration process on phenolic compounds and antioxidant activity in apple juice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 6, p. 2786-2792, 2019.

ANEXO A – Artigo de pesquisa

Food Research International 173 (2023) 113238



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Bioactive compounds recovery by freeze concentration process from winemaking by-product

Maíara Arbignus Bredun^a, Amanda Alves Prestes^b, Carolina Pretto Panceri^c, Elane Schwinden Prudêncio^{b,d}, Vivian Maria Burin^{a,d,*}

^a Postgraduate Program in Food Science, Federal University of Santa Catarina, Center of Agrarian Sciences, Itacorubi, 88024-001 Florianópolis, SC, Brazil

^b Postgraduate Program in Food Engineering, Federal University of Santa Catarina, Technology Center, 88040-900 Trindade, Florianópolis, SC, Brazil

^c Santa Catarina Federal Institute, Campus Urupema, 88625-000 Urupema, Santa Catarina, Brazil

^d Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina, Itacorubi, 88024-001 Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords

Grape extraction
Grape pomace
Anthocyanins
Phenolic compounds
Freeze concentration
By-product

ABSTRACT

Grape pomace is the main solid residue of wine industry, containing high amounts of phenolic compounds. Considering its high potential, an extraction procedure was optimized for maximal recovery of anthocyanins from grape pomace (*Vitis vinifera* L.) using citric acid as a generally recognized as safe (GRAS) addituent in water. Volume of solvent (3.2–85.6 mL), time (3.4–165.6 min) and pH of solvent (1.13–4.98) were the studied variables. Furthermore, the best condition to obtain extract rich in anthocyanins was submitted to the gravitational black freeze concentration process. The performance of the process was evaluated and cryoconcentrated and its fractions were analyzed for physicochemical properties, bioactive compounds content, and antioxidant activity. Interaction, linear, and quadratic effects for volume and pH of solvent were significant by analysis of variance (ANOVA). The experimental design allowed the prediction for maximal recovery of anthocyanins (3.0 mL of solvent at pH 1.9). The bioactive composition of the optimized grape pomace extract was influenced by the cryoconcentration process. After three cycles using gravitational black freeze concentration, the total phenolics and monomeric anthocyanins were approximately 4 and 5 times higher than the initial condition of the extract, respectively. Consequently, an increase in antioxidant activity was observed. The increase in the concentration of bioactive compounds reached a process efficiency of 90% (stage 1) for phenolic compounds and 91% (stage 2) for anthocyanins. Therefore, the final water-based optimized method is safe and has a low cost and the reconcentrated extract certainly showed higher concentrations of total phenolics and anthocyanins, compared to the initial extract. The proposed clean extraction method and cryoconcentration technique can be considered important strategies for recovering and valuing grape pomace components, improving the approach to the circular economy concepts in the wine industry.

1. Introduction

One of the main agro-industrial by-products produced worldwide is originate from grape processing (Teles et al., 2014; Zarkouni, 2017), mainly from the wine industry, with 75 million tons of grapes produced per year. According to Nunes et al. (2017), 1 kg of grapes is needed to produce 0.75 L of red wine. The main by-product generated in the winemaking process is pomace, which comprises the stalks, seeds and skins obtained after the pressing stage. Pomace has a general composition of fiber, lipids, proteins, soluble sugars and various phenolic

compounds such as catechins, flavonoids, phenolic acids and anthocyanins (de Souza et al., 2014; Nunes et al., 2017). It is noted that grape pomace is a natural resource of anthocyanins for exploitation in the development of food additives or nutritional supplement applications.

Anthocyanins play an important role in the food industry, both as natural colorants and as functional ingredients. Its potential to promote health and provide antioxidant benefits has driven research and development of new applications, allowing consumers to enjoy sensorially attractive foods with added health value. However, the color and stability of these pigments are influenced by pH, light, temperature,

* Corresponding author at: Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina, Admar Gonzaga Rd. 1346, Itacorubi, 88024-001 Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

E-mail address: vivian.burin@ufsc.br (V.M. Burin).

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113238>

Received 21 April 2023; Received in revised form 13 June 2023; Accepted 3 July 2023

Available online 4 July 2023

0963-9969/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.