

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TUFY KABBAS JUNIOR

DE REJEITO INDUSTRIAL A INGREDIENTES FUNCIONAIS: COMPOSIÇÃO
QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E EFEITOS PROTETORES EM CÉLULAS
HUMANAS DE EXTRATOS DE SEMENTES DE UVA (*Vitis labrusca* var. Bordeaux)
E AMORA-PRETA (*Rubus fruticosus* L.)

PONTA GROSSA

2023

TUFY KABBAS JUNIOR

DE REJEITO INDUSTRIAL A INGREDIENTES FUNCIONAIS: COMPOSIÇÃO
QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E EFEITOS PROTETORES EM CÉLULAS
HUMANAS DE EXTRATOS DE SEMENTES DE UVA (*Vitis labrusca* var. Bordeaux)
E AMORA-PRETA (*Rubus fruticosus* L.)

Defesa de Tese apresentada para a obtenção do título
de Doutor em Química na Universidade Estadual de
Ponta Grossa, Área de Concentração: Química
Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Granato

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mariza Boscacci Marques

PONTA GROSSA

2023

K11 Kabbas Junior, Tufy
De rejeito industrial a ingredientes funcionais: composição química, atividade antioxidante e efeitos protetores em células humanas de extratos de sementes de uva (*Vitis labrusca* var. Bordeaux) e amora-preta (*Rubus fruticosus* L.) / Tufy Kabbas Junior. Ponta Grossa, 2023.
119 f.

Tese (Doutorado em Química - Área de Concentração: Química),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Granato.

Coorientadora: Profa. Dra. Mariza Boscacci Marques.

1. Sementes. 2. Uva. 3. Amora-preta. 4. Compostos fenólicos. 5. Bioatividade. I. Granato, Daniel. II. Marques, Mariza Boscacci. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Química. IV.T.

CDD: 540

TERMO DE APROVAÇÃO

TUFY KABBAS JUNIOR

DE REJEITO INDUSTRIAL A INGREDIENTES FUNCIONAIS: COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E EFEITOS PROTETORES EM CÉLULAS HUMANAS DE EXTRATOS DE SEMENTES DE UVA (*Vitis labrusca* var. Bordeaux) E AMORA-PRETA (*Rubus fruticosus* L.)

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química (Associação UEL/UEPG/UNICENTRO) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientador:



Prof. Dr. Daniel Granato
UEPG e University of Limerick, Irlanda



Profa Dra Ana Barros
Universidade de Tras-os-Montes D'Ouro, Portugal



Prof. Dr. Erick Saldaña Villa
Universidad Nacional de Moquegua, Perú



Profa Dra Renata Dinnies Santos Salem
UEPG



Profa Dra Elaine Regina Lopes Tiburtius - UEPG

Ponta Grossa, 21 de julho de 2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por ter me concedido a graça divina, conhecida como vida, por ter me dado força, saúde e sabedoria para que eu pudesse me manter firme em meus objetivos e por sempre estar ao meu lado, nos momentos mais difíceis de minha jornada até aqui.

À minha mãe, Lucia de Melo Pedroso, que eu tanto amo e sempre amarei. Por todo esforço e luta empregado para que eu pudesse estar aqui, pelos seus conselhos e por todos os incentivos a mim oferecidos, para que eu concluísse mais esta etapa em minha vida.

Ao meu bom e velho pai, Tufy Kabbas, por quem eu tenho muito apreço, carinho respeito e amor. Por seu esforço incontestável, por ser um pai amigo e companheiro, em todos os momentos.

À minha esposa, Beatriz Marcondes Kabbas, que sempre me apoiou nas realizações de meus sonhos e que jamais mediu esforços para que eu alcançasse meus objetivos. Te amo muito!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Granato, pelas orientações. Sou imensamente grato pelo incentivo, apoio e confiança, que foram fatores importantíssimos para a realização e a conclusão deste trabalho.

À minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. Mariza Boscacci Marques, e a todos os parceiros, pelas contribuições prestadas no desenvolvimento do presente estudo.

À minha colega, Cristiane Moura, pela parceria e todo apoio prestado durante o doutorado, o qual foi crucial para eu conseguir concluir mais esta fase de minha vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos de doutorado.

A todos meu muitíssimo obrigado!

RESUMO

Este estudo teve por objetivos, estudar a composição química e propriedades funcionais de óleos de semente de uva bordô (*Vitis labrusca* Bordeaux) e amora-preta (*Rubus fruticosus* L.), bem como otimizar a extração de compostos bioativos hidrofílicos das sementes usando uma abordagem estatística. A tese foi delineada de forma que os objetivos, metodologia e resultados foram segmentados em dois capítulos: o *Capítulo 1* apresenta o estudo da fração lipídica, em que se aborda o conteúdo fenólico total, a atividade antioxidante, a composição de ácidos graxos e fitoesteróis, a atividade antimicrobiana, bem como a atividade citotóxica do extrato apolar da semente de uva e de amora; o *Capítulo 2* aborda a otimização da extração de compostos fenólicos com atividade antioxidante pelo uso de um delineamento composto rotacional, utilizando dois fatores (tempo e razão de material vegetal:solvente). Os resultados mostraram que os extratos apolares de sementes, obtidos pelo método Bligh-Dyer (BD), apresentaram os maiores níveis de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, tanto para amora quanto para uva, entretanto, apenas os extratos obtidos com extração por solvente a quente (Soxhlet) apresentaram efeito inibitório contra *Escherichia coli* (IAL 2064) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565). Quanto à viabilidade celular, os extratos apolares não apresentaram citotoxicidade ou efeito antiproliferativo nas diferentes linhagens celulares nas concentrações de 0 a 1000 µg/mL, o que mostra relativa segurança toxicológica dos extratos lipofílicos. Em relação a extração de compostos fenólicos das sementes de uva e amora, os parâmetros otimizados para maior rendimento de fenólicos e atividade antioxidante foram: tempo (35,9 e 62,1 min, respectivamente), relação massa-solvente (1:61,28 e 1:64,1 g:mL, respectivamente) utilizando etanol a 60% como solvente. Os principais compostos fenólicos detectados nos extratos foram: semente de uva ((-)-epicatequina – 833,1 mg/100g; epigallocatequina-3-galato – 785 mg/100g; (+)-catequina – 573,8 mg/100g; quercetina – 231,7 mg/100g e quercetina-3-rutinosídeo - 72,6 mg/100g) e amora (catequina – 88,8 mg/100g; (-)-epicatequina – 81,5 mg/100g; quercetina-3-glicosídeo - 35,3 mg/100g; ácido 3,4-Dihidroxibenzoico – 34,5 mg/100g e ácido 2,5-Dihidroxibenzoico;). Os extratos de semente de uva e amora diminuíram a geração intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO's) em células de adenocarcinoma humano (A549) e carcinoma de cólon humano (HCT8) quando expostas a H₂O₂. De

forma análoga, os extratos otimizados de semente de uva e amora mostraram efeito protetor sobre eritrócitos humanos, quando submetidos a condições hipotônicas, bem como isotônicas, além de não apresentarem comportamento hemolítico em relação à concentração testada. Assim, considerando os requisitos da Agenda 2030 e a necessidade de formas sustentáveis de produção de ingredientes alimentícios, concluímos que sementes de uva e amora podem ser utilizadas como fontes de antioxidantes lipídicos, a serem utilizados em diferentes aplicações tecnológicas.

Palavras-chave: sementes; *Vitis labrusca* Bordeaux; *Rubus fruticosus* L.; efeito inibitório; citotoxicidade; bioatividade *in vitro*.

ABSTRACT

This study aimed to study the chemical composition and functional properties of burgundy grape (*Vitis labrusca* Bordeaux) and blackberry (*Rubus fruticosus* L.) seed oils, as well as to optimize the extraction of hydrophilic bioactive compounds from these seeds using a statistical approach. The thesis was designed in such a way that the objectives, methodology and results were segmented into two chapters: *Chapter 1* presents the study of the lipid fraction, in which the total phenolic content, the antioxidant activity, the composition of fatty acids and phytosterols, the antimicrobial activity, as well as the cytotoxic activity of the non-polar extract of grape and blackberry seed were investigated; *Chapter 2* addresses the optimization of the extraction of phenolic compounds with antioxidant activity by using a rotational composite design, using two factors (time and plant material:solvent ratio). The results showed that the non-polar seed extracts, obtained using the Bligh-Dyer (BD) method, showed the highest levels of total phenolic compounds and antioxidant activity, both for blackberry and grape, however, only the extracts obtained with hot solvent extraction (Soxhlet) showed an inhibitory effect against *Escherichia coli* (IAL 2064) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565). Regarding cell viability, the non-polar extracts did not show cytotoxicity or antiproliferative effect on different cell lines at concentrations from 0 to 1000 µg/mL, which shows the relative toxicological safety of lipophilic extracts. When the extraction of phenolic compounds from grape and blackberry seeds was carried out, the optimized parameters for higher phenolic yield and antioxidant activity were: time (35.9 and 62.1 min, respectively), mass-solvent ratio (1:61, 28 and 1:64.1 g:mL, respectively) using 60% ethanol as solvent. The main phenolic compounds detected in the extracts were: grape seed ((-)-epicatechin – 833.1 mg/100g; epigallocatechin-3-gallate – 785 mg/100g; (+)-catechin – 573.8 mg/100g; quercetin – 231.7 mg/100g and quercetin-3-rutinoside - 72.6 mg/100g) and blackberry (catechin – 88.8 mg/100g; (-)-epicatechin – 81.5 mg/100g; quercetin-3 -glucoside - 35.3 mg/100g; 3,4-dihydroxybenzoic acid – 34.5 mg/100g and 2,5-dihydroxybenzoic acid;). Grape and blackberry seed extracts decreased intracellular generation of reactive oxygen species (ROS) in human adenocarcinoma (A549) and human colon carcinoma (HCT8) cells when exposed to H₂O₂. Similarly, the optimized grape and blackberry seed extracts showed a protective effect on human erythrocytes when subjected to hypotonic as well as isotonic conditions. Moreover, the extracts did not show hemolytic behavior in

relation to the tested concentration. Thus, considering the requirements of the 2030 Agenda and the need for sustainable ways of producing food ingredients, we conclude that grape and blackberry seeds can be used as sources of lipid antioxidants to be used in different technological applications.

Keywords: seeds; *Vitis labrusca* Bordeaux; *Rubus fruticosus* L.; inhibitory effect; cytotoxicity; *in vitro* bioactivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Delineamento da tese.....	20
Figura 2 - Principais compostos fenólicos presentes em diferentes frações da uva	22
Figura 3 - Produção do bagaço de uva nas etapas de produção de suco de uva (método de prensagem à quente).....	27
Figura 4 - Principais compostos fenólicos presentes em diferentes frações da amora	28
Figura 5 – Produção do bagaço de amora nas etapas de produção de suco de amora (método utilizando suquificador).....	34
Figura 6 - Biossíntese geral dos compostos fenólicos.....	36
Figura 7 - Extração assistida por ultrassom.....	43
Figura 8 - Extrator Soxhlet.....	44
Figura 9 - Extração Bligh-Dyer.....	46
Figura 10 - Viabilidade celular representativa de células A549 (A) Caco-2 (B), HepG2 (C) e IMR90 (D), após 48 h de exposição a extratos apolares de sementes de amora-preta e uva.....	65
Figura 11 - Resultados da medição de ERO's intracelular em células IMR90 (A), A549 (B), Caco-2 (C) e HepG2 (D) por espectrofluorimetria. Tratamento = extratos de sementes apolares de amora-preta e uva a 100 - 1.000 µg/Ml.....	66
Figura 12 - Efeito dos extratos liofilizados de uva (A) e amora (B) na hemólise de eritrócitos humanos em meio hipotônico.	91
Figura 13 - Resultados da medição intracelular de ERO's em células A549 (A) e HCT8 (B) por espectrofluorometria. Tratamento otimizado e extrato liofilizado de sementes de uva (<i>Vitis labrusca</i> cv. Bordeaux) ou sementes de amora (<i>Rubus fruticosus</i>) a 10-100 µg/mL. Os dados quantitativos são média ± desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).....	93
Figura 14 - Viabilidade celular e avaliação do efeito da concentração-dependente, após 48 h de exposição ao extrato hidroalcoólico liofilizado em linhagens celulares A549, HCT8, HepG2 e Ea.hy. (A) IC ₅₀ : concentração do	

agente que inibe o crescimento celular em 50%; (B) GI_{50} : concentração do agente que inibe o crescimento em 50%, em relação às células não tratadas; (C) LC_{50} : concentração do agente que resulta em uma perda líquida de 50% de células, em relação ao número no início do tratamento.....

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Compostos fenólicos e bioatividades da semente de uva.....	24
Quadro 2 - Compostos fenólicos e bioatividades da semente de amora.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Conteúdo fenólico total e atividade antioxidante de extratos apolares de sementes de amora-preta e uva.....	58
Tabela 2 - Compostos individuais de ácidos graxos e fitoesteróis de sementes de amora-preta e uva.....	61
Tabela 3 – Composição química e atividade antioxidante dos extratos de uva em relação ao tempo de extração e razão massa-volume.....	79
Tabela 4 - Composição química e atividade antioxidante dos extratos de amora em relação ao tempo de extração e razão massa-volume.....	80
Tabela 5 - Efeitos do tempo e razão x/s na extração de compostos bioativos e atividade antioxidante de semente de uva (<i>Vitis labrusca</i>).....	81
Tabela 6 - Efeitos do tempo e razão x/s na extração de compostos bioativos e atividade antioxidante de semente de amora (<i>Rubus fruticosus</i>).....	82
Tabela 7 - Valores previstos e experimentais para os extratos otimizados.....	86
Tabela 8 - Composição química dos extratos otimizados e liofilizados.....	88
Tabela 9 - Composição fenólica dos extratos liofilizados de uva e amora.....	89

LISTA DE SIGLAS

A549	Adenocarcinoma humano
AAE	Ácido ascórbico equivalente
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ACE-I	Enzima conversora da angiotensina I
AGE	Ácido gálico equivalente
ANOVA	Análise de variância unifatorial
ArO [•]	Íon fenolato estável
ArOH ⁺	Espécie catiônica também estabilizada por ressonância
BD	Bligh-Dyer
BSTFA	N, O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida
C:21	Ácido hienicosanoico
Caco-2	Adenocarcinoma colorretal humano
CAE	Catequina equivalente
CAT	Catalase
CCL-20	Quimiocina 20
CE	Cabamato de etila
CFT	Compostos fenólicos totais
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CRT	Capacidade redutora total
DCCR	Delineamento composto central rotacional
DCFH-DA	2',7'-diclorofluorescina diacetato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EA.hy926	Híbrido de célula endothelial
EC ₅₀	Mínima concentração necessária de antioxidante para inibir 50% de uma determinada concentração de radical
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
Ets	Elagitaninos
FADH	Flavina Adenina Dinucleotídeo reduzida

FRAP	Poder antioxidante redutor do ferro
GC-MS	Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa
GC ₅₀	Concentração do agente que inibe o crescimento em 50%, em relação às células não tratadas
GPx	Glutathione-peroxidase
HCT8	Carcinoma de cólon humano
HepG2	Células de câncer de fígado humano
HR	Espécie neutra não reativa
IMR90	Fibroblastos isolados do tecido pulmonar normal
IC ₅₀	Concentração do agente que inibe o crescimento celular em 50%
LC ₅₀	Concentração do agente que resulta em uma perda líquida de 50% de células, em relação ao número no início do tratamento
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NO	Óxido nítrico
NRCS	Natural Resources Conservation Service
PTP-1B	Proteína Tirosina Enzima Fosfatase 1B
QE	Quercetina equivalente
R ⁻	Espécie reduzida e energeticamente estável
RAW 264.7	Macrófago
SOD	Superóxido dismutase
Sox	Soxhlet
TE	Trolox equivalente
TMCS	Cloreto de trimetilsilil
TPTZ	2,4,6-tris (2-piridil)-S-triazina
US	Ultrassom
USDA	United States Department of Agriculture

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	17
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
OBJETIVOS.....	48
CAPÍTULO 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA/CITOPROTETORA DE EXTRATOS APOLARES DE SEMENTES DE UVA (<i>VITIS LABRUSCA</i> CV. BORDEAUX) E AMORA-PRETA (<i>RUBUS FRUTICOSUS</i>).....	49
RESUMO.....	49
1.1 INTRODUÇÃO.....	50
1.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
1.2.1 Reagentes.....	52
1.2.2 Materiais da Planta.....	52
1.2.3 Procedimento de Extração.....	53
1.2.4 Extração com Solvente Quente (SOXHLET).....	53
1.2.5 Extração usando Método Bligh-Dyer.....	53
1.2.6 Extração Assistida por Ultrassom.....	54
1.2.7 Conteúdo Fenólico Total e Atividade Antioxidante.....	54
1.2.8 Composição Química por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa (CG-MS).....	55
1.2.9 Atividade Antimicrobiana.....	56
1.2.9.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	56
1.2.10 Análise de Citotoxicidade.....	56
1.2.10.1 Viabilidade celular.....	56
1.2.11 Atividade Antioxidante Celular.....	57
1.2.12 Análise Estatística.....	57
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
1.3.1 Conteúdo Fenólico Total e Atividade Antioxidante.....	57
1.3.2 Composição de Ácidos Graxos e Fitoesteróis.....	60
1.3.3 Atividade Antimicrobiana.....	62

1.3.4	Determinação da Toxicidade Celular dos Extratos Apolares das Sementes e Medição de ERO's (Espécies Reativas de oxigênio).....	63
1.4	CONCLUSÕES.....	68

CAPÍTULO 2 - OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO QUÍMICA VERDE DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE SEMENTES DE UVA (*VITIS LABRUSCA* L.) E AMORA (*RUBUS FRUTICOSUS* L.) COM AVALIAÇÕES CONCOMITANTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA E ANTIOXIDANTE.....

	RESUMO.....	70
2.1	INTRODUÇÃO.....	71
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	72
2.2.1	Reagentes Químicos e Células.....	72
2.2.2	Material Vegetal.....	73
2.2.3	Obtenção dos Extratos Hidroalcoólicos e Otimização da Extração.....	73
2.2.4	Composição Química dos Extratos Otimizados e Liofilizados.....	74
2.2.5	Atividade Antioxidante.....	75
2.2.6	Perfil de Toxicidade e Atividade Antioxidante Baseada em Células.....	76
2.2.7	Efeito Anti-Hemolítico <i>in vitro</i>	77
2.2.8	Análise Estatística.....	77
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
2.3.1	Efeito do Tempo de Extração e Razão Sólido-Solvente na Composição Fenólica Total e Atividade Antioxidante.....	78
2.3.2	Composição Química dos Extratos Otimizados e Liofilizados.....	87
2.3.3	Composição Fenólica por LC-MS.....	89
2.3.4	Atividade Anti-Hemolítica.....	90
2.3.5	Geração de ERO's Intracelular e Viabilidade Celular.....	92
2.4	CONCLUSÃO.....	95

CONCLUSÕES GERAIS.....	96
PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS.....	97
REFERÊNCIAS.....	98
APÊNDICE A - PERFIS PARA VALORES PREVISTOS E DESEJABILIDADE UVA (A) E AMORA (B).....	117
APÊNDICE B - ENSAIOS TESTADOS DE FORMA ALEATÓRIA.....	118
APÊNDICE C - PARÂMETROS DE ESPECTROMETRIA DE MASSA PARA ANÁLISE DE CADA COMPOSTO FENÓLICO.....	118

INTRODUÇÃO

As uvas (*Vitis* sp.) constituem uma das mais importantes culturas de frutas do mundo porque podem ser consumidas como frutas frescas, bem como na forma de vinho, suco e outros produtos processados (TALBOTT; HUGHES, 2008; LIANG et al., 2014). A produção nacional de uvas destinadas ao processamento (vinho, suco e derivados) foi de aproximadamente 698 mil toneladas, em 2019, representando 48,28% da produção total de uvas, já o restante da produção (51,72%) foi destinado ao consumo *in natura* (EMBRAPA, 2020).

Vale ressaltar que a concentração da produção de uva no Brasil está localizada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste, sendo uma atividade econômica consolidada, com grande importância socioeconômica. Em vista disso, o Brasil vem se consolidando como um importante produtor mundial de suco de uva, devido ao fato de gerar grande quantidade de resíduos diversos, como o bagaço, que corresponde a aproximadamente 20% da fruta processada. A saber, o bagaço constitui-se de casca e semente, em que apresenta uma composição rica e heterogênea em compostos fenólicos (flavonoides e não flavonoides) (BRUNNER, 2005).

Também convém citar a amora (*Rubus* sp.), que é um fruto amplamente conhecido por conter quantidades notáveis de compostos fenólicos, incluindo flavonóis, ácido clorogênico e procianidinas, que possuem alta atividade biológica e podem proporcionar benefícios à saúde humana, ou seja, como antioxidantes dietéticos (DELVALLE; AGUILERA, 1999). Assim, a amora tem sido usada em indústrias de alimentos para produzir sucos, sorvetes, iogurtes, e geleias. No entanto, o processamento das amoras gera cerca de 20% de resíduos, compostos principalmente por casca e sementes, que contêm grandes quantidades de compostos bioativos (GUO et al., 2003).

Os principais Estados produtores desse fruto estão localizados nas regiões Sul e Sudeste, sendo eles, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo. No estado de Santa Catarina, a produção de amora abrange uma área de aproximadamente 10 ha, com valores estimados em 7,7 ton/ha. Em outros estados, como Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo e Minas Gerais, as áreas de cultivo também são significativas, com valores de 22,1 a 239,2 hectares (EMBRAPA, 2017).

É pertinente salientar que o bagaço (sementes e casca) de uvas e amoras é, geralmente, descartado, sem aproveitamento de sua composição química. Em muitos casos, essas partes das frutas podem apresentar maior atividade biológica se comparado com a polpa. Utilizar resíduos do processamento torna-se, portanto, uma maneira de aproveitamento e conversão em coprodutos, com atividade biológica demonstrada por métodos *in vitro* e *in vivo*, com maior valor agregado (BORGES et al., 2015). Além disso, a utilização de resíduos representa um segmento do agronegócio para a valorização de espécies de frutas nativas brasileiras, por meio de estudos químicos, desenvolvimento e inovação tecnológica, ou seja, é uma forma de incentivar, também de fomentar, tanto o plantio, como o consumo, ainda, preservar a biodiversidade. Nesse sentido, obter conhecimento da constituição química desses frutos e de suas frações poderá contribuir para um melhor aproveitamento, tanto na indústria alimentícia, quanto cosmética, permitindo, assim, a sua valorização econômica (DE AZEVEDO et al., 2014).

Atualmente, a busca por produtos fonte de compostos bioativos tem chamado a atenção, por trazer diversos benefícios à saúde e, com isso, vem incentivando os pesquisadores a estudar e cultivar diferentes espécies vegetais, fontes de fenólicos com atividade antioxidante, antimicrobiana e potencial protetor de células contra câncer (BRAVO, 1998; ZIELINSKI et al., 2014; SANTOS et al., 2018).

O interesse pela descoberta de novos antioxidantes, seguros e extraídos de fontes naturais, deve-se, principalmente, ao fato de prevenir o dano oxidativo às células, sendo capaz de diminuir ou prevenir, significativamente, a oxidação de membranas celulares. É fato que a ação antioxidante desses compostos pode atuar em diferentes estágios no processo de oxidação, ao diminuir a concentração de radicais livres, quelar íons e até mesmo decompor produtos primários, além de levar a compostos não radicalares, que auxiliam o equilíbrio do sistema imunológico (BRAVO, 1998; SOARES, 2002; GRANATO et al., 2018).

Evidências clínicas e experimentais mostram que os compostos fenólicos desempenham importante papel na proteção celular, pois são capazes de sequestrar ou inibir as diversas espécies de oxigênio reativo, transferir elétrons para radicais livres e ativar enzimas antioxidantes (DUMITRIU et al., 2015), logo, diminuem o risco do estresse oxidativo, apontado como causa de algumas doenças, como arteriosclerose e outras doenças cardiometabólicas, diabetes do tipo 2 e doenças neurodegenerativas (ASADI et al., 2010). Qi et al. (2021) identificaram melhoras em

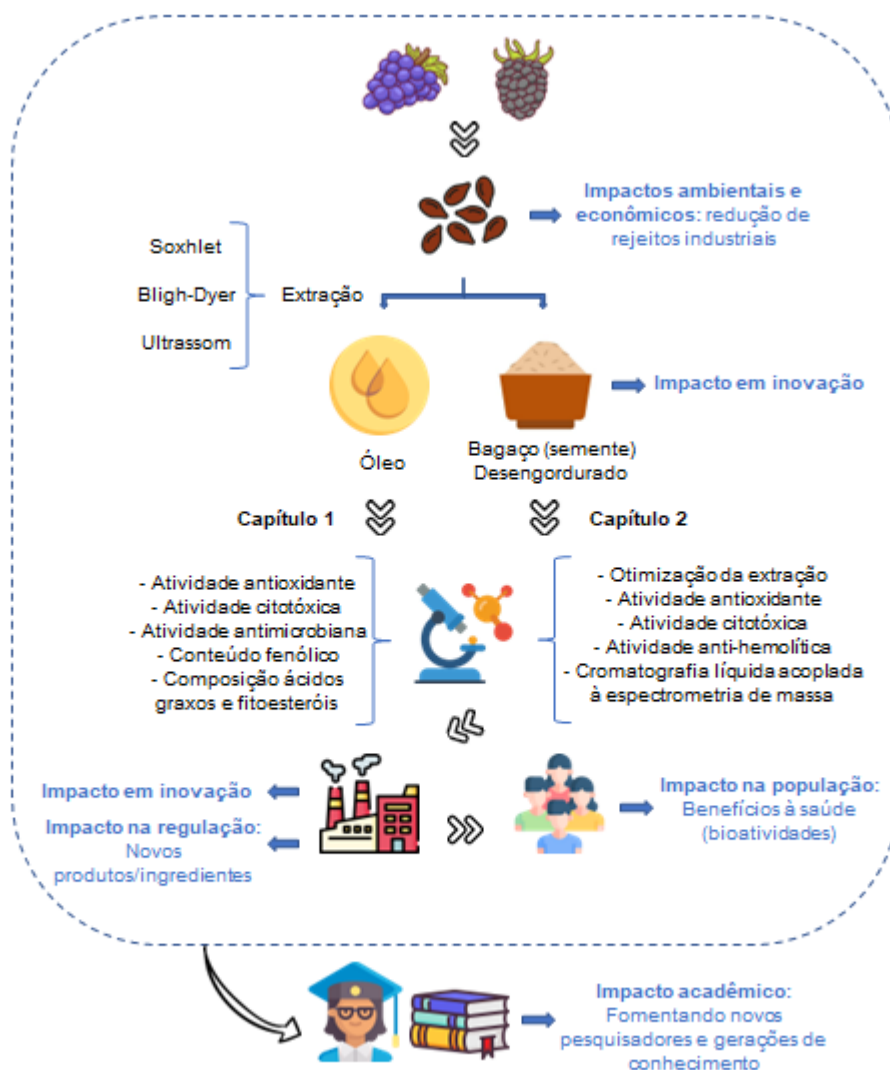
lesões de células-tronco hematopoiéticas em camundongos, utilizando compostos fenólicos (proantocianidinas) extraídos da semente de uva. Ademais, esses compostos estão frequentemente associados à inibição do crescimento de células cancerígenas (JARA-PALACIOS et al., 2015; LEE et al., 2006), além da ação anti-inflamatória, analgésica, gastroprotetora (LAJILI et al., 2016) e antimicrobiana, (CENTIN-KARACA; NEWMAN, 2016; GONÇALVES et al., 2017).

A atividade antimicrobiana é outra característica importante dos compostos fenólicos, já que a resistência dos micro-organismos, frente a agentes antibacterianos, tem se tornado um problema global (SHEN, 2014). Em resposta a essa resistência, a procura por novos compostos com propriedades antibacterianas tem chamado a atenção para isolar e identificar esses compostos, capazes de inibir o crescimento bacteriano ou ter ação bactericida, através da inativação das enzimas celulares, além de mudanças na permeabilidade das membranas celulares (SHEN, 2014; BELDA-GALBIS et al., 2015). Os polifenóis também podem se destacar, pelo seu potencial antiproliferativo, devido a suas propriedades antioxidantes e pró-oxidantes (CARMO et al., 2018).

Nesse contexto, o presente trabalho visa estabelecer uma metodologia técnico-analítica para a extração e a caracterização química e de bioatividades das frações lipídicas e fenólicas dos resíduos de processamento do bagaço de uva e amora. Para isso, diferentes métodos de extração foram testados e avaliados, em relação ao rendimento, composição química, atividade antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa.

A tese foi delineada de forma que os objetivos, metodologia e resultados foram segmentados em capítulos, como mostra a Figura 1: *Capítulo 1*, que apresenta o estudo da fração lipídica, em que se aborda o conteúdo fenólico total, a atividade antioxidante, a composição de ácidos graxos e fitoesteróis, a atividade antimicrobiana, bem como a atividade citotóxica do extrato apolar da semente de uva e de amora. No *Capítulo 2*, mostra-se o estudo do material desengordurado, em que se aborda a otimização da extração, através de ensaios estatísticos, conteúdo fenólico total, atividade antioxidante, atividade citotóxica e análise quantitativa da composição dos extratos.

Figura 1 – Delineamento da tese.



Fonte: O autor.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

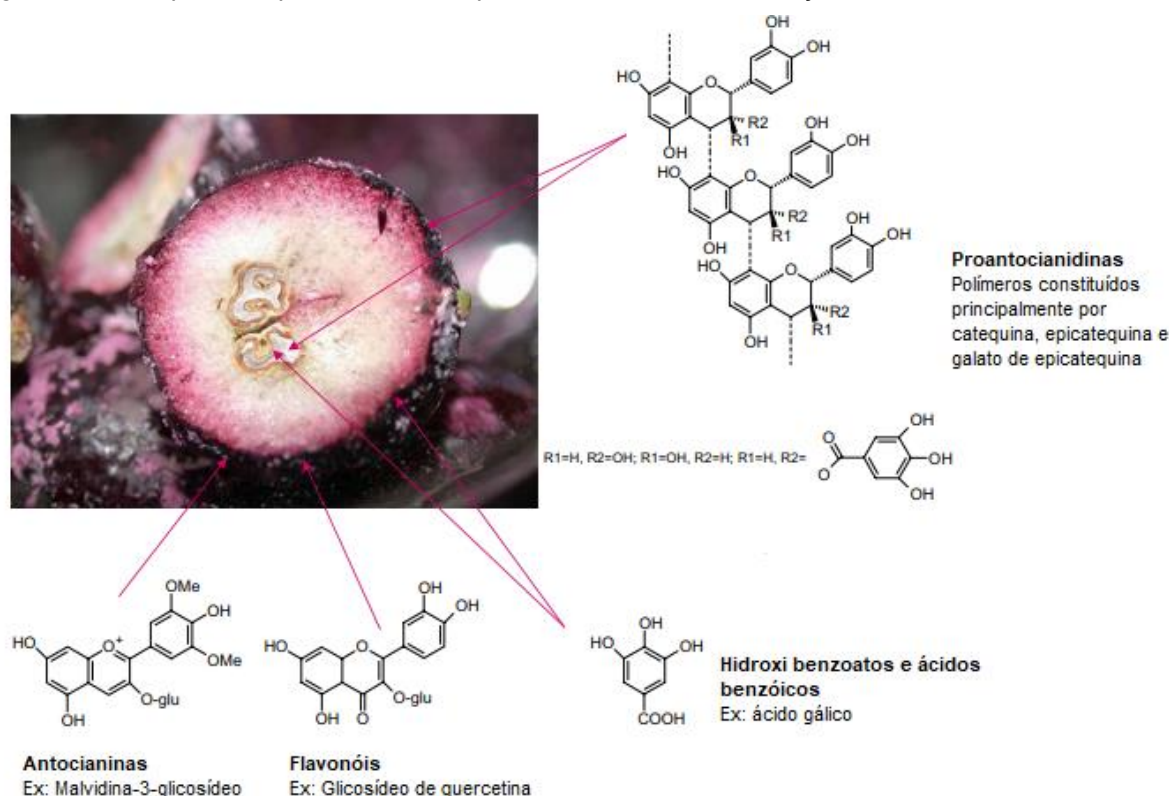
UVA (*Vitis* sp.)

O bagaço da uva é composto por casca, caule e semente, então, representa o resíduo de maior volume na indústria do vinho e do suco (FONTANA et al., 2013; YU; AHMEDNA, 2013). Vale destacar que as sementes de uva representam aproximadamente 40-50% dos resíduos sólidos do processo de produção (BRENES et al., 2016), já o óleo de semente de uva é capaz de contribuir para os efeitos nutracêuticos, devido à sua composição e capacidade antioxidante, sendo assim, ele apresenta diversas aplicações, principalmente em formulações de cosméticos (CECCHI et al., 2019).

Segundo a *The Plant List*, 2013, o gênero *Vitis* L. inclui 68 espécies. O *United States Department of Agriculture* (USDA) e o *Natural Resources Conservation Service* (NRCS) identificaram as espécies de uva, a saber: *Vitis acerifolia* Raf. (uva em folha de bordo), *Vitis aestivalis* Michx. (uva de verão), *Vitis amurensis* Rupr. (Uva Amur), *Vitis arizonica* Engelm. (uva de garganta), *Vitis californica* Benth. (Uva selvagem da Califórnia), *Vitis cinerea* Engelm. ex Millardet (uva whitebark), *Vitis girdiana* Munson (uva selvagem do deserto), *Vitis labrusca* L. (uva fox), *Vitis monticola* Buckley (uva doce da montanha), *Vitis mustangensis* Buckley (uva mustang), *Vitis x novae-angliae* Fernald, *Vitis palmata* Vahl (uva catbird), *Vitis riparia* Michx. (uva de rio), *Vitis rotundifolia* Michx (muscadina), *Vitis rupestris* Scheele (uva de areia), *Vitis shuttleworthii* House (uva insensível), *Vitis tiliifolia* Humb. e Bonpl. ex Schult. (Uva das Índias Ocidentais), *Vitis vinifera* L. (uva europeia ou de vinho), *V. vinifera* L. ssp. *sylvestris* Hegi (uva selvagem) e *V. vulpina* L. (uva congelada).

Flavonoides, como flavanóis e flavonóis, estilbenos, como o *trans*-resveratrol, e ácidos fenólicos, como o ácido gálico, ácidos vanílico, siríngico e cafeico, constituem a base da composição fenólica das uvas e produtos derivados (TEIXEIRA et al., 2013). Em estudos realizados por Fiume et al. (2014), os fenólicos extraíveis nas uvas estão dispostos da seguinte forma: cerca de 10% estão presentes na polpa, 28-35% na casca e 60-70% nas sementes. Na Figura 2 estão representados os principais compostos fenólicos presente em diferentes frações da uva.

Figura 2 – Principais compostos fenólicos presentes em diferentes frações da uva.



Fonte: Adaptado de Pinelo; Arnous; Meyer (2006).

Efeito antioxidante, anti-inflamatório, anticâncer, neuroprotetor, anti-hipertensivo, dentre outras funções, são algumas das várias atividades biológicas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, determinadas em estudos anteriores (YUN et al.2020); (WANG et al., 2020; WANG; HUANG; ZHAN, 2019; ARAFAT; SHABAAN, 2019; CHEN et al., 2019). Estudos realizados por Hakimuddin et al. (2008), Singh et al. (2011), Schlachterman et al. (2008) e Singletary et al. (2003), evidenciaram atividade anticâncer e antimetastática, quando testados *in vivo* e *in vitro* contra células de câncer utilizando compostos fenólicos específicos (antocianidinas, proantocianidinas e resveratrol), extraídos a partir de vinhos e sementes. Segundo Yang et al. (2001), o mecanismo de ação que poderia impedir iniciação tumoral *in vivo* e *in vitro*, pode estar relacionado à atividade antioxidante, anti-inflamatória e antiproliferativa dos compostos fenólicos da uva. Os compostos fenólicos e as bioatividades estão descritos no Quadro 1.

Ainda nessa linha de observação, em relação a óleo e polifenóis, as sementes de uva também contêm oligossacarídeos, carboidratos que possuem ação prebiótica em seres humanos (BORDIGA, 2016). É pertinente acrescentar que uma das ações

mais bem determinadas de oligossacarídeos é a atividade prebiótica (QIANG; YONGLIE; QIANBING, 2009), em que os prebióticos são definidos como substratos seletivamente utilizados por microorganismos existentes no hospedeiro, conferindo benefícios à saúde (SWANSON et al., 2020). Visto que sementes e cascas de uva são fontes mais valiosas em compostos com alta atividade biológica do que a polpa do fruto, é de grande importância o aprofundamento dos estudos para determinar as propriedades biológicas com ensaio *in vivo* e *in vitro* das partes morfológicas da uva, para a concepção de produtos alimentícios com alta qualidade sensorial e relacionada à saúde. Além disso, as sementes são partes integrantes do bagaço, logo, a sua utilização na indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética sofre aumento, que é economicamente justificado.

Quadro 1 – Compostos fenólicos e bioatividades da semente de uva.

(continua)

Semente	Extração (solvente)	Conteúdo fenólico total	Compostos Individuais	Bioatividades	Referências
Uva (<i>Vitis sp.</i>)	Hidroalcoólico 60% (álcool etílico)	13643±690 mg AGE/g	Delfinidina-3-glicosídeo Malvidina-3-glicosídeo Cianidina-3-glicosídeo Malvidina-3,5-diglicosídeo Ácido 2,5 dihidroxibenzoico Ácido 2,4 dihidroxibenzoico Ácido Siríngico Ácido 5-O-cafeoilquínico Ácido gálico Ácido 2-hidroxicinâmico Ácido elágico Quercetina Quercetina-3-rutinosídeo (+)-Catequina (-)-Epicatequina <i>trans</i> -resveratrol	Poder antioxidante redutor de ferro (FRAP) Folin-Ciocalteu capacidade de redução da atividade de eliminação do radical DPPH; atividade anti- hipertensiva	Deolindo et al., (2019)
	Etanol/água ácida (pH 3,2) 7:3 v/v	Não determinado	Ácido vanílico Ácido <i>p</i> -cumárico <i>E</i> -resveratrol Quercetina Kaempferol Pinoresinol	poder inibitório frente a PTP-1B (Proteína Tirosina Enzima Fosfatase 1B)	Cecchi et al., (2019)
	Etanol/água (80:20, v/v)	161,66 mg AGE/g	Ácido fenólico Ácido gálico (-)-Epicatequina Galato de epigalocatequina Galato de epicatequina Epigalocatequina Procianidina B1 Procianidina B4	Citotoxicidade em macrófago RAW 264.7 Atividade anti- inflamatória	Harbeoui et al., (2019)

Quadro 1 – Compostos fenólicos e bioatividades da semente de uva.

(conclusão)

			Procianidina B2 Flavonol Kaempferol Miricetina Quercetina		
	50 mL tampão de acetato a 1:10 p/v e enzimas	0,81 g AGE/100 g	Ácido gálico Ácido <i>p</i> -cumárico Ácido Sirínico (+)-Catequina Resveratrol Malvidina-3-O- glicosídeo	Trolox equivalente capacidade antioxidante (TE)	Meini et al., (2019)

Nota: AGE = Ácido gálico equivalente, DPPH = 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, FRAP = Poder antioxidante redutor do ferro, TE = Trolox Equivalente, RAW 264.7 = macrófago, PTP-1B = Proteína Tirosina Enzima Fosfatase 1B.

Fonte: Fidelis et al. (2019).

Deolindo et al. (2019) afirmam que extratos hidroetanólicos (60% v/v) de semente de uva (*Vitis labrusca* cv. Bordeaux) apresentam não somente uma atividade antioxidante, baseando-se na análise frente ao radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), (3637 ± 4 mg AAE (ácido ascórbico equivalente/100 g), mas, também, potencial para inibir a atividade de ACE-I (enzima conversora da angiotensina I) *in vitro*. Nunes; Pimentel; Costa; Alves e Oliveira (2016) justificam a inibição da atividade do ACE-I aos compostos fenólicos presentes no suco de uva, casca e sementes, principalmente, devido à presença de (+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-galocatequina e (+)-epigallocatequina.

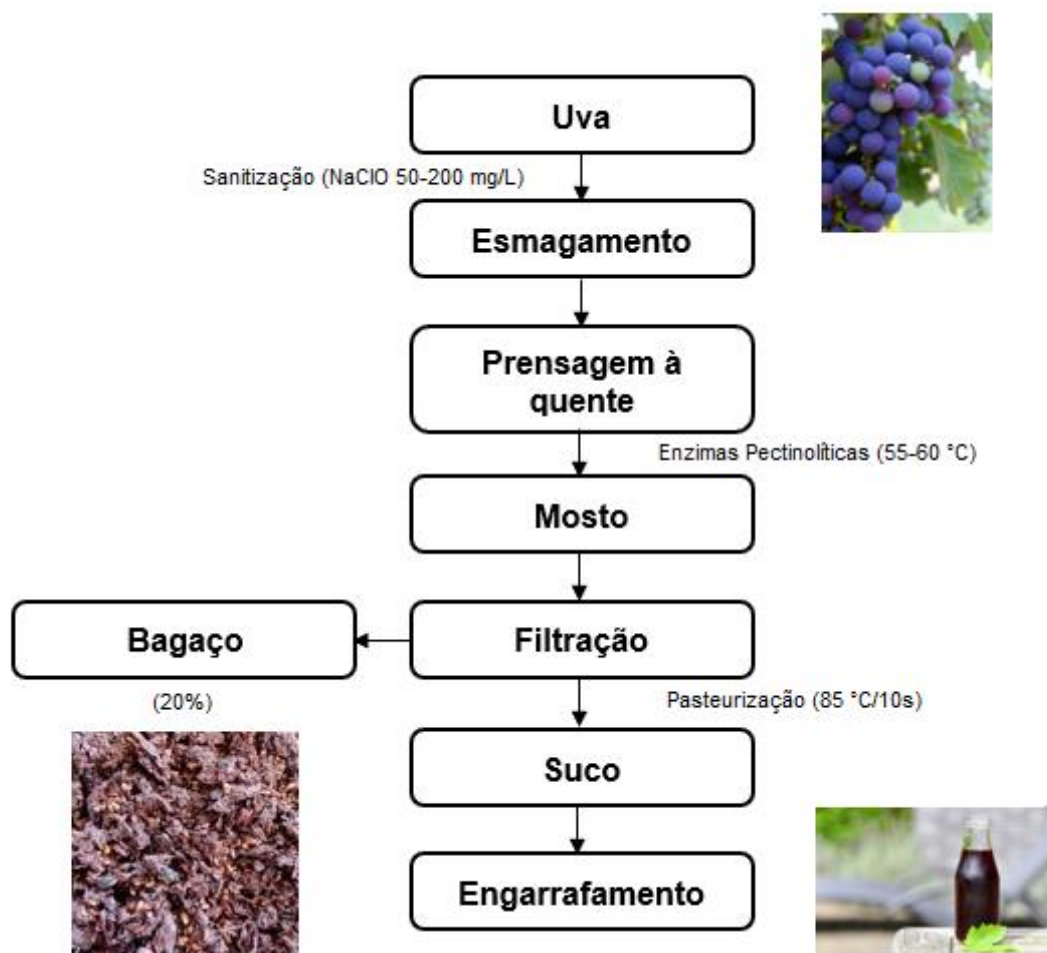
Harbeoui et al. (2019) confirmaram a capacidade anti-inflamatória de maneira dose-dependente do extrato hidroetanólico (80%) de sementes de uvas *Vitis vinifera* L. inibindo a expressão e a produção de diferentes inflamatórios. Os autores sugeriram, também, que os diferentes mecanismos envolvidos nesta atividade anti-inflamatória poderiam se dar, devido ao sinergismo entre vários compostos fenólicos, bem como os elementos estruturais específicos de flavonoides (fração dominante).

Ainda sob essa perspectiva, um estudo epidemiológico demonstrou que o consumo de uvas e seus produtos, como vinho e suco, está relacionado a vários efeitos benéficos à saúde humana, incluindo uma redução do risco de câncer (DINICOLA et al., 2014). Em estudos clínicos, o consumo de vinho demonstrou ter um efeito protetor contra adenocarcinoma de pulmão (DE STEFANI et al., 2002) e apresentou atividade no combate ao desenvolvimento de câncer de pulmão (RUANO-RAVINA; FIGUEIRAS; BARROS-DIOS, 2004). Chao et al. (2007) sugeriram que o consumo equilibrado de vinho poderia ser associado ao combate do desenvolvimento de câncer de pulmão.

Além disso, o estudo multidisciplinar, realizado por Di Meo et al. (2019), reforça que a extração de novas moléculas fenólicas de sementes de uva podem ser vistas como fonte de novos metabólitos, com atividade biológica para serem utilizados como nutracêuticos ou novos medicamentos para o tratamento de mesotelioma maligno (tipo de câncer que afeta as células do revestimento interno de certas partes do corpo, especialmente tórax e abdome). Com uma combinação de sementes e cascas de uva como suplementos em uma dieta para camundongos, que foram inoculados com carcinoma, Ehrlich et al. (2019) observaram que ocorreu inibição efetiva no crescimento do tumor via mecanismos que envolvem parada do ciclo celular e apoptose, demonstrando, assim, que o suplemento pode possuir grande potencial

para quimioprevenção natural do crescimento de tumores. Assim, mesmo com vários estudos sobre as sementes e polpa da uva, nenhum estudo foi feito comparando os efeitos das extrações Soxhlet, Bligh-Dyer e Ultrassom, em relação às bioatividades, composição de ácidos graxos e fenólicos totais dos rejeitos (sementes) de uva. A Figura 3, demonstra uma das varias formas de produção de bagaço de uva (produção de suco).

Figura 3 - Produção do bagaço de uva nas etapas de produção de suco de uva (método de prensagem à quente).



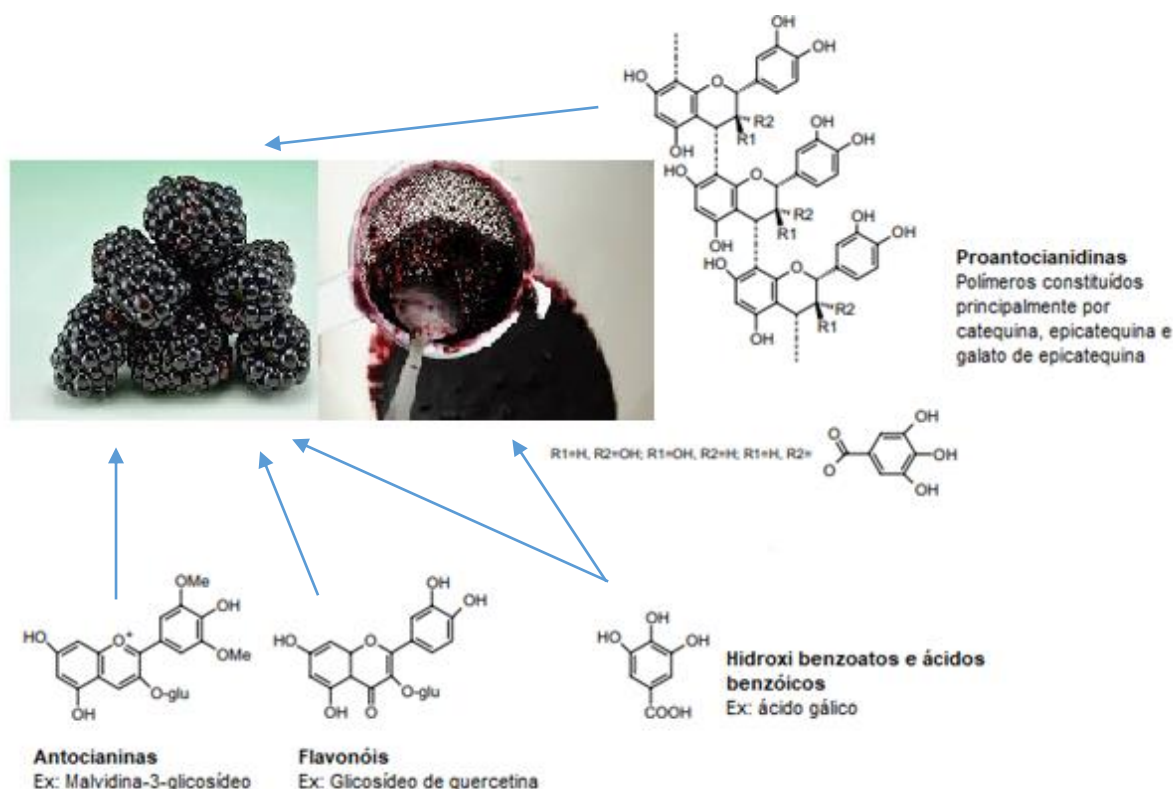
Fonte: O autor.

AMORA (*Rubus* sp.)

As amoras são colhidas e consumidas globalmente, devido ao seu bom gosto e alto teor de compostos bioativos naturais, como fibras, vitaminas, fitoesteróis, carotenoides e ácidos orgânicos, que podem ter efeitos benéficos na saúde humana

(RAO; SNYDER, 2010). Um amplo espectro de compostos fitoquímicos tem sido relatado em amoras, incluindo ácidos fenólicos, flavonoides, eróis, carotenoides e ácidos orgânicos (MORAES et al., 2020; TOMAS et al., 2019). O subgrupo antocianina dos flavonoides está entre os principais componentes em amoras (DA FONSECA MACHADO et al., 2018; YAMA-SHITA et al., 2017). As principais antocianinas relatadas em amoras consiste de cianidinas, incluindo cianidina-3-glicosídeo, seguido por cianidina-3-xilosídeo, cianidina-3-malonilglicosídeo, cianidina-3-dioxalilglucosídeo e cianidina-3-sambubiosídeo (ZIA-UL-HAQ et al., 2014). O consumo de amora, portanto, promove a saúde, pois exibe muitas atividades biológicas, devido à sua riqueza em compostos bioativos (HUSSEINET et al., 2018; MORAES et al., 2020; TOMAS et al., 2019). Na Figura 4, estão representados os principais compostos fenólicos presente em diferentes frações da amora.

Figura 4 – Principais compostos fenólicos presentes em diferentes frações da amora.



Fonte: O autor.

O fruto consumido como fresco, mas também processado de várias formas, a amora-preta, pertencente ao gênero *Rubus*, é rica em polifenóis, como antocianinas e outros antioxidantes, que contribuem para sua atividade antioxidante (DAI et al.,

2009). Nesse sentido, as atividades biológicas relacionadas à amora-preta são retratadas em estudos, os quais demonstram ações de proteção contra agentes de estresse oxidativos, endotoxicidade, doenças neurodegenerativas relacionadas à idade, obesidade, câncer e doenças cardiovasculares (SAUTEBIN et al., 2004; SERRAINO et al., 2003; KAUME; HOWARD; DEVAREDDY, 2012). Os compostos fenólicos e bioatividades da amora estão representadas no Quadro 2.

Quadro 2 - Compostos fenólicos e Bioatividades da semente de amora.

(continua)

Semente	Extração (solvente)	Conteúdo fenólico total	Compostos Individuais	Bioatividades	Referências
Amora (<i>Rubus</i> sp.)	Metanol:acetona:água (7:7:6, v/v/v), Acetona:água (8:2, v/v), Metanol:água (7:3, v/v), Água, dietil éter:acetato de etila (1:1, v/v)	13 mg AGE/g extrato seco	Ácido protocatecuico Ácido p-cumárico Ácido gálico Hexósido gálico Ácido cafeico Ácido siríngico (+)-Catequina (-)-Epicatequina Epigallocatequina Galato de epicatequina Tipo B dímeros de procianidina Quercetina Quercetina 3-O-glicuronídeo Quercetina Pentose Miricetina Peonidina 3-O-glicosídeo	Atividade antioxidante Eliminação de OH• (125 µmol TE/g extrato seco), ORAC (60 µmol TE/g extrato seco), Redução potência (88 µmol TE/g extrato seco), Inibição contra a oxidação do colesterol LDL humano (21-60% de 0 a 22 h), Quelante de Ferro(II) (199 µmol TE/g extrato seco), Inibição de OH• e Cisão de fita de DNA superenrolada induzida por OOR• (85–95% para OH• e 90–95% para OOR•)	Ayoub; De Camargo; Shahidi, (2016)
Amora (<i>Rubus ulmifolius</i>)	Metanol	171 mg AGE/g de sementes secas	Cianidina 3-O-glicosídeo Ácido elágico Galloil-HHDP-glicose Galoil-bis-HHDP-glicose	Atividade antioxidante DPPH (93, 96 e 98% de radicais eliminados em 42,	Fazio et al., (2013)

Quadro 2 - Compostos fenólicos e Bioatividades da semente de amora.

(conclusão)

				83, 167 µg/mL de extratos, respectivamente; EC ₅₀ = 1 µg/mL) Atividade anti-inflamatória Fortes efeitos inibitórios sobre a produção de mediadores inflamatórios induzidos por LPS (NO, CCL-20)	
Amora (<i>Rubus fruticosus</i>) 3 cultivares	Metanol:água (1:1, v/v)	Não determinado	Elagitanninos (41 compostos) Derivados de ácido elágico (10) Derivados de ácido gálico (4) Ácido protocatecuico Ácido clorogênico Ácido salicílico	Efeito protetor nas aberrações cromossômicas em linfócitos humanos periféricos	Godevac et al., (2011)
Óleo de semente, (<i>Rubus fruticosus</i>)	Metanol:água (1:1, v/v)	5,6-9,1 mg CAE/g óleo	Ácido <i>p</i> -cumárico Ácido vanílico Vanilina	Atividade antioxidante FRAP (equivalente a 0,3 FeSO ₄ (µmol/L)/g óleo)	Van Hoed et al., (2011)

Nota: LDL= lipoproteína de baixa densidade, TE = Trolox equivalente, LPS = lipopolissacarídeo, NO = Óxido nítrico, AGE = Ácido gálico equivalente, CAE = Catequina equivalente, DPPH = 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, FRAP = Poder antioxidante redutor do ferro, FeSO₄ = Sulfato de ferro, EC₅₀ = mínima concentração necessária de antioxidante para inibir 50% de uma determinada concentração de radical, CCL-20 = Quimiocina 20.

Fonte: Fidelis et al. (2019).

Em continuidade, no estudo realizado por Gowd et al. (2018) foi possível concluir que os polifenóis, presentes na amora-preta, possuem potencial antioxidante e antidiabético. Os estudiosos sugerem, também, que os polifenóis (antocianinas) de amora são biotransformados (através de metabólitos intestinais) em metabólitos fenólicos mais ativos, com potente atividade antidiabética, através de atividades antioxidantes, o que possibilita afirmar que os frutos ricos em polifenóis podem ser considerados alimentos funcionais, e a suplementação dietética de amora poderia ajudar na manutenção da boa saúde.

Micić et al. (2015), ao analisarem óleos de semente de amora e framboesa, identificaram que eles são ricos em ácidos graxos essenciais. Os autores, então, ao compararem as constantes da taxa de oxidação, demonstraram que o óleo de amora mostrou-se mais estável à oxidação do que o óleo de semente de framboesa. Segundo os pesquisadores, a razão para isso é uma quantidade menor de ácido linolênico no óleo de amora, devido a este ser menos estável, em termos de oxidação. Vale ressaltar que, embora ambos os óleos sejam altamente insaturados, eles apresentam estabilidade oxidativa semelhante a alguns óleos comerciais, provavelmente, devido ao alto teor de tocoferóis dos óleos de sementes.

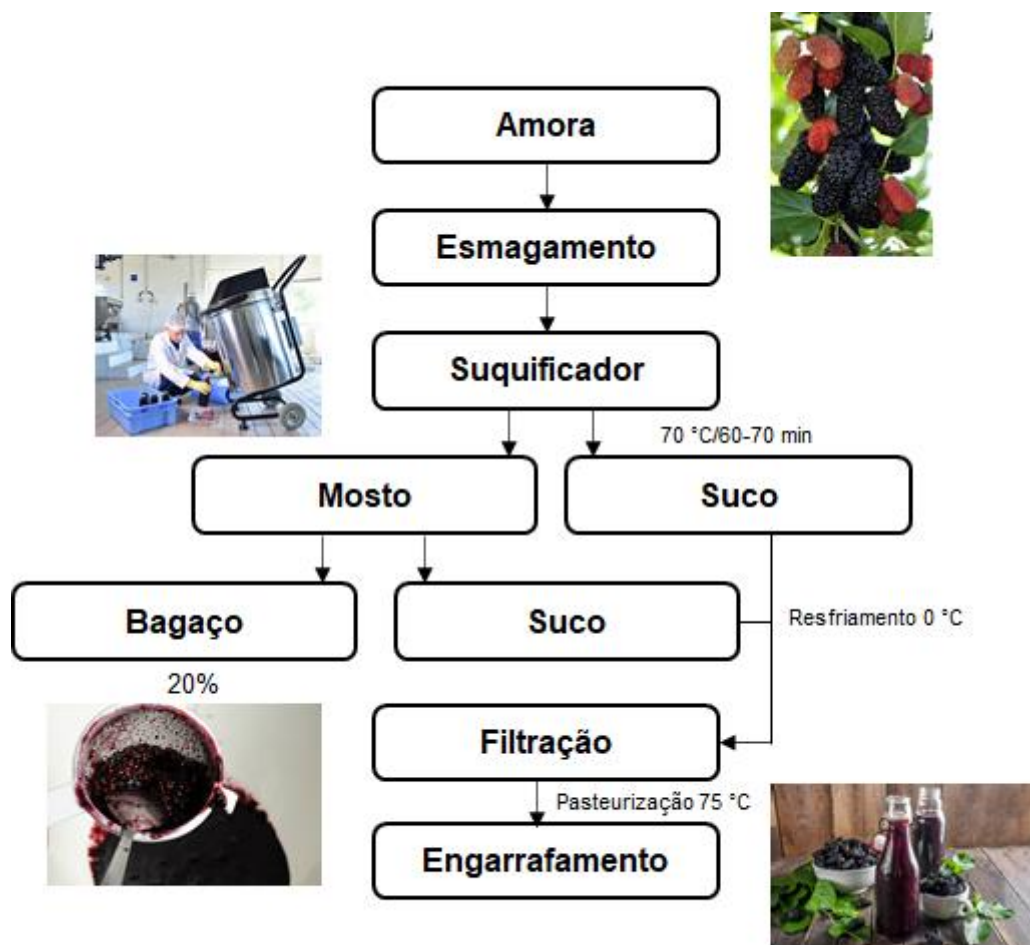
Diante disso, os benefícios da amora-preta à saúde foram atribuídos à alta quantidade de cianidina-3-O-glucosídeo, por suas propriedades antioxidantes (KAUME; HOWARD; DEVAREDDY, 2012). Em vista desses aspectos, relatórios indicam que a ingestão de antocianinas diminuem o risco de diabetes e doenças cardiovasculares (CASSIDY et al., 2013; VAN DAM; NAIDOO; LANDBERG, 2013; WEDICK et al., 2012). Ainda, a partir dos resultados apresentados por Gowd; Bao e Chen, (2018), ao estudarem extrato de antocianina de amora-preta, foi possível concluir que esse componente possui uma potencial atividade antioxidante celular.

Zannou e Koca (2022), em seu estudo de técnicas verdes de extração com a utilização de amoras, identificaram concentração fenólica total ($9,35 \pm 0,39$ mg AGE/g), teor total de flavonoides ($104,72 \pm 5,17$ mg CAE/100g), teor total de antocianinas ($115,37 \pm 0,43$), ação antirradical ($68,77 \pm 2,29$ mmol TE/g), poder redutor ($83,08 \pm 3,78$) e atividade quelante de metal ($4771,25 \pm 83,58$ mg TE/100g), além de identificar antocianinas, como cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3-rutinosídeo e pelargonidina-3-glucósido. Chen et al. (2016), em seus estudos, demonstraram que homogenatos de amora, submetidos a tratamento gastrointestinal *in vitro*, protegeram

as mitocôndrias da peroxidação lipídica da membrana e do potencial colapso dela, prevenção da depleção da glutathione celular, atenuando a citotoxicidade induzida por carbamato de etila (CE), em células Caco-2. Após digestão gastrointestinal, simulada *in vitro*, os autores determinaram que o melhor desempenho na melhoria da citotoxicidade induzida por CE pode estar associado ao aumento do conteúdo de duas antocianinas (cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-dioxalglicosídeo), que pode ter implicações na prevenção de doenças, causadas por CE.

Tomas et al. (2019), a partir de seus estudos, concluíram que as antocianinas, que atingem o intestino grosso, promovem a formação de compostos de baixo peso molecular, como 4-vinilfenol, ácido benzoico e tirosol, juntamente com outros compostos fenólicos ácidos (isto é, ácidos ferúlico e gálico). O aumento de metabólitos fenólicos, provavelmente, por possuir potencial antioxidante, faz com que a amora-preta seja adicionada com fibras solúveis, tornando-se um potencial alimento funcional. Poucos estudos relatam sobre as propriedades das sementes de amora e nenhum estudo foi feito comparando os efeitos das extrações Soxhlet, Bligh-Dyer e Ultrassom, em relação às bioatividades, composição de ácidos graxos e fenólicos totais dos rejeitos (sementes) de amora. A Figura 5, demonstra uma das varias formas de produção de bagaço de amora (produção de suco).

Figura 5 - Produção do bagaço de amora nas etapas de produção de suco de amora (método utilizando suquificador).



Fonte: O autor.

COMPOSTOS FENÓLICOS

Em relação às plantas, uma importante característica delas é a capacidade de sintetizar uma grande diversidade de compostos, denominados metabólitos secundários, que apresentam um papel essencial ou não ao metabolismo vegetal. O metabolismo secundário vem sendo estudado e isso permite a elucidação da estrutura química de cerca de 50.000 compostos (DE LUCA; ST PIERRE, 2000). Convém explicitar que os polifenóis são substâncias que, geralmente, não fazem parte do metabolismo básico da planta, possuem características químicas muito variadas e, às vezes, bastante complexas (TAIZ; ZEIGER, 1998). A visão de que os metabólitos secundários não apresentam uma função específica, e são simplesmente produtos finais das reações e/ou erros do metabolismo, tem mudado substancialmente, na

medida em que descobertas sobre as funções desses compostos têm sido alcançadas.

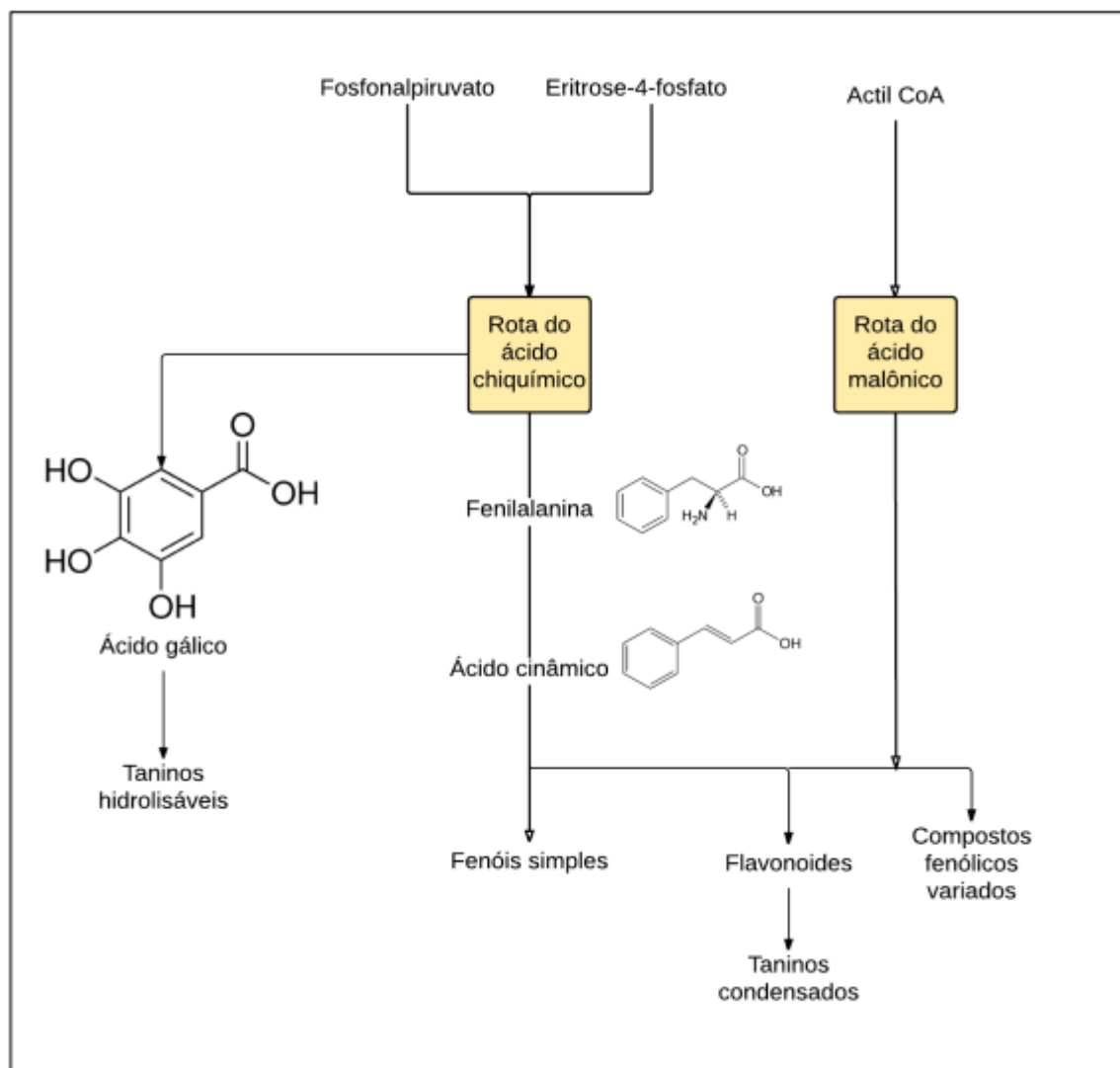
No metabolismo secundário das plantas são gerados os compostos fenólicos, que se encontram nos vegetais, na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas, essenciais para o seu crescimento, bem como sua reprodução. Estes compostos se formam em condições de estresse, como infecções, ferimentos, radiação ultravioleta, dentre outras (BRAVO, 1998; NACZK; SHAHIDI, 2004). O reconhecimento das propriedades antioxidantes desses compostos tem construído uma nova visão em direção aos efeitos benéficos que podem apresentar à saúde (KAUR; KAPOOR, 2001). As principais fontes de compostos fenólicos são frutas cítricas, como limão, laranja e tangerina, além de outras frutas, como cereja, uva, ameixa, pêra, maçã e mamão (ANGELO; JORGE, 2007).

Os compostos fenólicos são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa dos frutos. Definidos quimicamente como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (LEE et al., 2005), os compostos fenólicos de maior ocorrência natural apresentam-se conjugados com mono e polissacarídeos, através de um ou mais grupos fenólicos. Esses compostos também podem ocorrer como derivados funcionais, como ésteres e metil ésteres.

Assim, é importante destacar que os compostos fenólicos, de acordo com sua estrutura química, são divididos em classes: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e taninos, além de determinar sua atividade antioxidante. Dentre as classes de compostos fenólicos presentes em plantas e reconhecidos como componentes da dieta estão, principalmente, os flavonoides e os ácidos fenólicos (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

A maioria dos compostos fenólicos são sintetizados, por meio da fenilalanina, como mostra a Figura 6, a qual aponta a via do ácido chiquímico da origem, principalmente a compostos mais simples, como os ácidos fenólicos, ligninas e cumarinas. Já a combinação de ambas as vias (via do ácido chiquímico e via do ácido malônico), conduz à formação dos compostos com massa molecular maior, como os flavonoides, o grupo mais abundante de compostos fenólicos na natureza (SÁNCHEZ-MORENO, 2002), além de outros grupos, mais complexos, como os taninos condensados.

Figura 6 - Biossíntese geral dos compostos fenólicos.



Fonte: Adaptado de Taiz e Zeiger (2009).

ESPÉCIES REATIVAS E O ESTRESSE OXIDATIVO

Moléculas orgânicas, inorgânicas ou átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, assim são classificados os radicais livres (BOYCE, 1999). Essa estrutura faz com que esses radicais apresentem alta instabilidade, ou seja, eles têm meia-vida curta e são muito reativos. Essas espécies são responsáveis pela oxidação (prejudicial), que pode danificar membranas e conteúdos celulares, um exemplo são as lipoproteínas de baixa densidade (HALLIWELL, 2007). Gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, os radicais livres têm como alvo celular as proteínas, os lipídios, os carboidratos e o DNA (YU; ANDERSON, 1997). As principais consequências da ação das espécies reativas são: doenças degenerativas, como

câncer, doenças cardiovasculares, queda do sistema imunológico, disfunções cerebrais, catarata, entre outras (ARUOMA, 1994; CHEUNG; CHEUNG; OOL, 2003).

O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes, que resulta em danos celulares pelos radicais livres, é chamado estresse oxidativo (DÁVALOS; GOMES-COROVÉS; BARTOLOMÉ, 2003). Como consequência do estresse oxidativo, a peroxidação lipídica causa uma série de mudanças nos sistemas biológicos, tais como a ruptura das membranas celulares, mutações na estrutura do DNA, oxidação dos lipídeos insaturados, formação de resíduos químico e comprometimento de componentes da matriz extracelular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Além disso, o estresse oxidativo é fator crucial no desenvolvimento e no agravamento de algumas doenças crônicas humanas, como: diabetes mellitus, catarata, doença de Parkinson, danos cerebrais na doença de Wilson, doença de Alzheimer, isquemia cerebral, esclerose lateral amiotrófica, ataxia de Friedreich, câncer, aterosclerose, artrite, doenças neurodegenerativas e no aceleração do processo de envelhecimento (HERMES-LIMA, 2004).

Ademais, a formação de espécies reativas é um mecanismo inevitável em organismos aeróbicos, uma vez que, em situações normais, somente 95 a 97% do oxigênio absorvido é reduzido na cadeia respiratória, por meio do transporte de elétrons, bem como no retículo endoplasmático, tendo por produto final água (KEHRER, 2014). As fontes que cedem os cátions de hidrogênio e os elétrons necessários para a reação são, basicamente, dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (NADH), dinucleótido de flavina e adenina reduzido (FADH) e a coenzima Q (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). As moléculas de oxigênio, que não são devidamente reduzidas pelo sistema endógeno (3 a 5%), recebem apenas um elétron, o qual vai ocupar um dos orbitais externos, ao mesmo tempo em que o outro continua não emparelhado, produzindo intermediários altamente reativos, denominados Espécies Reativas de Oxigênio – ERO's, Equação 1, 2, 3 e 4 (SLATER, 1988):



Relacionada a danos em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos em diferentes sistemas biológicos, a formação de ERO's causa deficiência funcional e estrutural em diferentes moléculas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Nesse sentido, o consumo de compostos com propriedades antioxidantes tem sido recomendado, para evitar ou retardar os danos ocasionados pelo estresse oxidativo em humanos (SAKANAKA; TACHIBANA; OKADA, 2005). Assim, cada vez mais, aumenta o interesse na identificação de compostos antioxidantes, uma vez que eles podem manter o equilíbrio entre a produção de oxidantes e a concentração de compostos antioxidantes, que minimizam os danos oxidativos no organismo (CHIDAMBARA-MURTHY; JAYAPRAKASHA; SINGH, 2002).

ANTIOXIDANTES

Um antioxidante é uma substância que, quando presente em baixa concentração, em relação ao substrato na forma oxidável, retarda ou inibe a sua oxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Os compostos fenólicos e carotenoides são os principais compostos bioativos em alimentos de origem vegetal, como frutas, verduras, chás, entre outros. Esses compostos restringem os efeitos maléficos causados pelos radicais livres ao organismo, por meio do retardo da velocidade de oxidação, através de um ou mais mecanismos, como inibição de radicais livres e complexação de metais, isto é, são capazes de proteger as células dos agentes oxidantes, evitando efeitos nocivos em diversos órgãos (PIMENTEL; FRANCKI; BOIAGO, 2005). Classificados em primários e secundários, os compostos fenólicos, tocoferol, aminoácidos, carotenoides e os antioxidantes sintéticos formam a classe dos primários, que atuam como doadores de prótons, impedindo o processo de iniciação causado pelos radicais livres.

Convém expor que a maioria dos flavonoides tem a capacidade de reagir com radicais livres e exercer funções antioxidantes no organismo. Já os antioxidantes secundários, classe formada pelos antioxidantes sintéticos, as vitaminas A, C e E, também pelos compostos fenólicos, atuam no bloqueio da decomposição dos peróxidos e hidroperóxidos, convertendo-os na forma inativa, por ação de agentes redutores, que inibem a reação em cadeia, através da captação de intermediários reativos, como os radicais peroxila e alcooxila (DONELLI; ROBINSON, 1995; PIETTA,

2000). Uma importante reação deteriorativa dos alimentos, que gera substâncias tóxicas, além de levar a efeitos adversos, como carcinogênese, mutação do DNA celular e envelhecimento, é a peroxidação lipídica, que ocorre durante o armazenamento dos alimentos, pela doação de elétrons ou de átomos de hidrogênio às gorduras, que contêm um radical livre, formando um complexo entre a cadeia lipídica e o radical.

Os antioxidantes, portanto, têm sido classificados como os compostos que neutralizam a cadeia de radicais livres na oxidação lipídica, interrompendo a cadeia de radicais livres das reações oxidativas, formando eles mesmos radicais livres estabilizados, que não iniciam ou propagam futuras oxidações lipídicas (*Free radical terminators*). Nessa lógica, estudos realizados em óleos comestíveis e em produtos à base de peixe, carne e aves, extratos ricos em compostos fenólicos, apresentam atividade antioxidante comparável a dos antioxidantes sintéticos (KAUR; KAPOOR, 2001; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Assim, para se determinar qual antioxidante é apropriado, deve-se levar em consideração a compatibilidade entre o efeito do antioxidante e as propriedades alimentares do produto (KAUR; KAPOOR, 2001).

Isso pode se dar a partir da origem endógena (enzimáticos), como as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione-peroxidase (GPx) e catalase (CAT); bem como exógena (não-enzimáticas), as quais apresentam uma gama de minerais e substâncias, destacando-se algumas vitaminas, carotenoides, ácidos fenólicos e flavonoides, ou seja, as defesas dos antioxidantes têm papel fundamental na prevenção e na diminuição dos 35 efeitos prejudiciais do estresse oxidativo (KAO et al., 2010; FUKAI; USHIO-FUKAI, 2011).

Vários critérios podem ser utilizados para caracterizar os antioxidantes, como: sua polaridade, função e mecanismo de ação. Em relação à polaridade, os compostos antioxidantes podem ser classificados como hidrofílicos (solúveis em água), tais como ácido ascórbico, antocianinas, ácido gálico, entre outros, ou ainda como lipofílicos (solúveis em solventes orgânicos), como α -tocoferol, licopeno e β -caroteno (SIES, 2007). LÓPEZ; DENICOL (2013) afirmam que a capacidade de um antioxidante de chegar ao local em que as espécies reativas são geradas é um aspecto crítico e, por essa razão, a polaridade do composto antioxidante deve ser levada em consideração no mecanismo de ação.

Por sua vez, os antioxidantes, em relação às suas funções, podem apresentar a capacidade sequestrante de radicais livres (ácido ascórbico, tocoferóis, entre outros), sequestrante de oxidantes não radicalares (catalase e tióis), além da função inibitória da geração de oxidantes (agentes quelantes de metais, tais como os compostos fenólicos) e capacidade de induzir a produção de antioxidantes (isotiocianatos) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Além disso, o processo de neutralização da ação deletéria de espécies reativas nas membranas celulares, por antioxidantes, pode ocorrer por três mecanismos principais: a transferência de átomo de hidrogênio, a transferência de elétrons, e também podem apresentar capacidade de quelar metais de transição, tais como zinco, ferro e cobre (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Nesse processo, ainda pode ocorrer uma ação combinada de mecanismos de transferência de átomo de hidrogênio e transferência de elétrons. Vale citar que o mecanismo de transferência de átomos de hidrogênio ocorre quando o antioxidante, ArOH, por exemplo, reage com o radical livre R[•], por meio da transferência de átomo de hidrogênio, perceptível na Equação 5 (APAK et al., 2016).

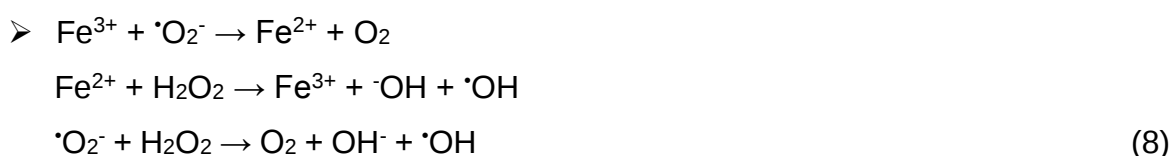


A Equação 6, na sequência, ilustra o mecanismo de transferência de um elétron, supondo que um antioxidante doa um elétron para a molécula oxidante.



Os produtos de reação, por meio dos dois mecanismos, mostram uma espécie neutra não reativa (HR), um íon fenolato estável (ArO[•]), uma espécie catiônica, também estabilizada por ressonância (ArOH⁺), ainda, uma espécie reduzida e energeticamente estável (R⁻), respectivamente (OROIAN; ESCRICHE, 2015). O radical livre, ArO[•], e a espécie catiônica, ArOH⁺, são estabilizadas pela deslocalização de elétrons pi do anel aromático. Além desses dois mecanismos de reação, têm sido citadas, na literatura, análises que medem a capacidade antioxidante, por meio da habilidade de um composto em quelar íons metálicos. De acordo com Santos; Brizola; Granato (2017), os íons de cobre e ferro estão altamente relacionados com a produção de diferentes espécies reativas, em especial as de oxigênio, decorrente das reações

de Fenton (Equação 7) e de Haber-Weiss (Equação 8). Canabady-Rochelle et al. (2015) afirmam que os compostos com capacidade de quelar metais de transição atuam indiretamente como antioxidante, uma vez que a reação de Fenton e de Haber-Weiss são inibidas por sua ação.



Fonte: SANTOS; BRIZOLA; GRANATO (2017).

Tendo em vista a variabilidade entre os mecanismos de ação de uma substância antioxidante, Apak et al. (2013) ressaltam que, uma vez que muitos mecanismos e reações múltiplas estão envolvidos, nenhum método refletirá de forma fidedigna a atividade de todos os compostos antioxidantes em uma matriz complexa, como sucos, chás e vinhos. Dessa forma, torna-se conveniente a utilização de mais de um método e com distintos mecanismos de ação, com o intuito de compreender de forma mais ampla o potencial antioxidante de produtos naturais.

Existem alguns argumentos com relação à segurança e aos efeitos adversos, causados pelos antioxidantes artificiais, quando usados como aditivos alimentares. Tais argumentos não se enquadram nos antioxidantes naturais, como as vitaminas e os polifenóis, responsáveis por papéis importantes na prevenção de doenças associadas aos radicais livres (SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2003).

EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

Dentre as tecnologias atuais de extração, o ultrassom (Figura 7) tem sido amplamente reconhecido, como ecologicamente correto, barato, rápido e eficiente para extração de fenólicos, devido à cavitação acústica, causada pela passagem de ondas de ultrassom. A saber, a cavitação acústica consiste na formação, crescimento e colapso de microbolhas na superfície sólida, levando à corrosão e erosão, que

resultam na ruptura das paredes celulares, além de permitirem a penetração do solvente e a melhora da transferência de massa, bem como ao aumento de rendimento de extração e o encurtamento no tempo de extração (TAO; ZHANG; SUN, 2014).

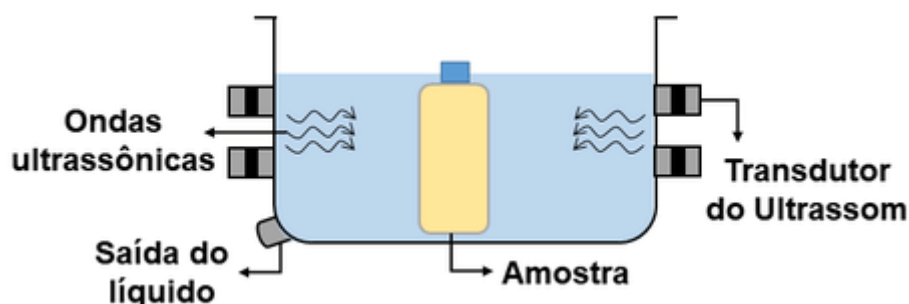
Em relação aos fatores que podem influenciar o processo de extração na extração assistida por ultrassom (EAU), vale destacar o teor de umidade, amostra, tamanho da amostra, solvente empregado, temperatura, frequência e tempo de sonda (AZMIR et al., 2013). Assim, com a utilização de uma proporção reduzida de solvente/amostra sólida (WU, 2001) e temperaturas mais baixas, a técnica evita danos térmicos aos extratos e minimiza a perda de compostos bioativos (HROMÁDKOVÁ; KOVÁČIKOVÁ; EBRINGEROVÁ, 1999). Também, com o uso de um equipamento simples, permite-se a adição de um co-solvente, o qual altera a polaridade da fase líquida. Como desvantagens, o solvente não pode ser renovado durante o processo, o que limita sua eficiência, pois requer filtração e evaporação do solvente no processo e a seletividade de extração é baixa (LUQUE-GARCÍA; LUQUE DE CASTRO, 2003).

A tecnologia ultrassônica, a partir de estudos, vem sendo apontada como uma ferramenta eficaz para extração de óleo vegetal de sementes. Samaram, Mirhosseini, Tan e Ghazali (2014) estudaram a extração assistida por ultrassom para a recuperação de óleo de sementes de mamão e determinaram que o óleo permanece mais estável, com a cor mais clara e o menor nível de matérias insaponificáveis, em comparação com Soxhlet e outros métodos de extração por solvente. Da Porto; Porretto e Decorti (2013) determinaram que a extração assistida por ultrassom foi eficiente na extração de óleo de sementes de uva, quando em comparação com a extração de Soxhlet (20 kHz e 150 W por 30 min). Romanini et al. (2021), após estudarem o bagaço (casca) de uva, afirmaram que os extratos aquosos obtidos pelo uso do ultrassom, apresentaram maiores níveis de atividade antioxidante (1,4 vezes), antocianinas (1,3 vezes) e fenólicos totais (1,2 vezes), em comparação com a extração convencional, apenas com o uso de água (25 °C), sem a assistência ultrassônica.

Tanto as conclusões dos estudos feito por Martínez Lapuente et al. (2021), quanto as obtidas por Pérez-Porras et al. (2021), indicam que a sonicação da uva facilita a liberação de polissacarídeos, antocianinas e taninos das cascas e a extração

de taninos das sementes. Deng et al. (2022) afirmam que a técnica ultrassônica melhora a eficiência da extração e o perfil dos lipídios. O tratamento ultrassônico, portanto, tem uma influência positiva na composição, antioxidante, estabilidade e propriedades antimicrobianas. As tecnologias de extração acopladas ao ultrassom, normalmente, extraem lipídios de forma mais eficiente, devido ao efeito sinérgico.

Figura 7 - Extração assistida por ultrassom.



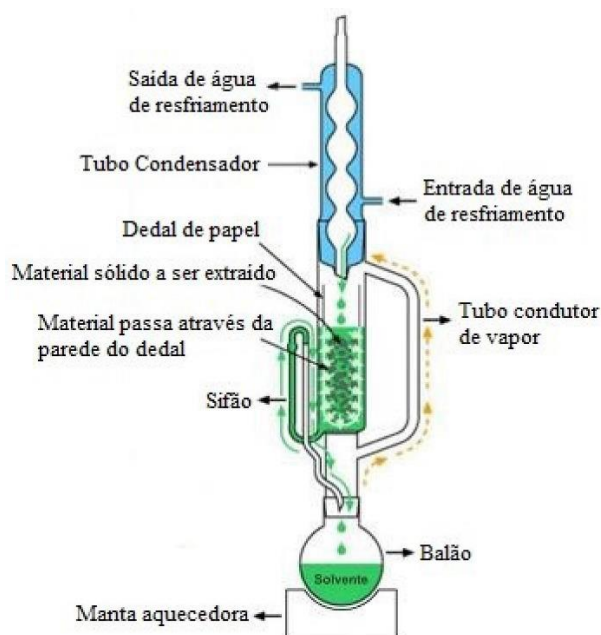
Fonte: O autor.

EXTRAÇÃO SOXHLET

Von Soxhlet desenvolveu, em 1879, um novo sistema de extração (extrator Soxhlet), considerada a técnica de lixiviação mais utilizada até hoje (SOXHLET, 1879). Tal técnica padrão, que se mantém por mais de um século, é ponto de partida para o desenvolvimento de uma variedade de novas técnicas, tanto é que as vantagens e desvantagens da extração Soxhlet têm sido estudadas para aliviar ou suprimir os problemas encontrados na obtenção de métodos eficazes de extração. Com o principal objetivo de melhoria, as modificações relatadas nas últimas décadas visam ao aprimoramento da extração Soxhlet, com o intuito de aproximá-la de técnicas mais recentes.

Originalmente usada para determinar gordura do leite (SOXHLET, 1879), a técnica baseia-se em colocar a amostra em um porta-dedal, que é gradualmente preenchido com solvente de um balão de destilação (Figura 8). Quando o solvente atinge o nível de transbordamento, o sifão aspira o volume do porta-dedal e descarrega-o de volta no balão de destilação, levando, assim, os analitos extraídos.

Figura 8 - Extrator Soxhlet.



Fonte: Costa, Guimarães; Reis e Santana (2017).

Como vantagens da extração Soxhlet convencional, pode-se destacar: a amostra é repetidamente colocada em contato com porções frescas de solvente, o que facilita o deslocamento do equilíbrio de transferência; o sistema permanece em alta temperatura - por efeito do calor aplicado ao balão de destilação - dispensa filtração após a lixiviação; o rendimento da amostra pode ser aumentado pela realização de extrações simultâneas em paralelo, o que é facilitado pelo baixo custo do equipamento básico; é uma metodologia muito simples, que requer pouco treinamento; mais massa de amostra pode ser utilizada ao se comparar com a maioria das alternativas mais recentes (extração assistida por micro-ondas, extração de fluido supercrítico etc.) e, por fim, existe uma grande variedade de métodos oficiais envolvendo uma etapa de preparação de amostra, com base na extração de Soxhlet (LUQUE DE CASTRO, 2010).

Como desvantagens da extração de lipídios pelo método de Soxhlet, pode-se destacar: longo tempo necessário para a extração e a grande quantidade de solvente desperdiçado, que além de ser caro para descartar, também é fonte de problemas ambientais (LUQUE DE CASTRO, 2010). Di Stefano et al. (2021), em estudo sobre a extração Soxhlet e prensagem a frio de sementes de uva, concluíram não haver diferenças significativas entre as técnicas em relação à obtenção de triacilgliceróis e

determinaram que o óleo da semente de uva apresenta ácido linoleico (70%), ácido oleico (17%), ácido palmítico (9%) e ácido esteárico (3%). Piasecka; Górska; Ostrowska-Lig e Kalisz (2021) determinaram que o óleo de semente de amora, extraído por Soxhlet, apresenta maior estabilidade oxidativa ao se comparar com óleos de “chokeberry” e framboesa, devido ao maior teor de ácidos graxos saturados.

EXTRAÇÃO BLIGH-DYER

Folch et al. (1957) desenvolveram um método usando uma mistura de clorofórmio e metanol, seguida pela adição de solução de cloreto de potássio (KCl) , visando a uma melhor separação das fases. Bligh e Dyer modificaram o método de Folch et al. (1957) e propuseram um “método rápido para extração e purificação dos lipídios totais”, no qual utilizaram amostras de músculo de bacalhau. Com o objetivo de atingir condições ótimas para a extração lipídica, os pesquisadores aplicaram a teoria do equilíbrio líquido-líquido de três componentes: clorofórmio/metanol/água (BLIGH e DYER, 1959).

O método de Bligh e Dyer (1959) é eficaz na extração de lipídios totais, principalmente os polares, mas apresentam desvantagens, como: o metanol é nitidamente tóxico, causando dores de cabeça se o local de trabalho não for adequadamente ventilado e o clorofórmio é potencialmente carcinogênico; apresenta custo elevado (solventes) e possui a característica indesejável de dissolver apreciáveis quantidades de não lipídios, por exemplo, algumas proteínas (NELSON, 1991). Apesar de suas desvantagens, os métodos de Folch et al. (1957) e Bligh e Dyer (1959) são largamente utilizados, tanto como propostos originalmente, quanto modificados. Uma das vantagens do método desenvolvido por Bligh e Dyer (1959) é a formação de um sistema bifásico (Figura 9), a partir das proporções de solventes adicionados durante o processo de extração, que facilita a separação dos compostos desejáveis.

Ulmer et al.(2021), em estudo sobre o plasma humano, identificaram que a extração por Bligh-Dyer apresentou melhores resultados da análise lipidômica, independentemente do volume de extração do solvente, frente ao método Matyash. Já no estudo em sementes de *Maqui berry*, Bastías-Montes et al. (2019) determinaram que a extração pelo método Bligh Dyer apresentou resultados superiores ao método

Soxhlet, por mostrar uma análise de correlação positiva entre tocóis totais e atividade antioxidante.

O método Bligh-Dyer também apresentou melhores resultados nos estudos de Buszewska-Forajta et al. (2022), na extração lipídica em amostras de urina de pacientes com câncer de próstata. Maurer et al. (2019), no estudo com bagaço de uva e a extração Bligh-Dyer, determinaram que a ingestão de fibras auxilia, de forma notável, na proteção contra doenças intestinais. Moraes et al. (2020), ao estudarem amoras e utilizarem extração Bligh-Dyer para a obtenção da fração lipídica, determinaram que os flavonoides foram as classes de compostos mais encontradas nas amoreiras estudadas. Antocianinas, como cianidina-3-O-glucosídeo, flavanóis, como (-)-epicatequina e (+)-catequina, e flavonóis, como quercetina e kaempferol, foram identificados.

Figura 9 – Extração Bligh-Dyer.



Fonte: O autor.

APLICAÇÃO TECNOLÓGICA DE EXTRATOS RICOS EM COMPOSTOS FENÓLICOS

Atualmente, a adição de frutas, sucos ou extratos ricos em compostos fenólicos em diversos produtos alimentícios é uma tendência. Dessa forma, é cada vez mais comum encontrar estudos que fazem adição de compostos funcionais em matrizes proteicas.

Santos et al. (2018), otimizando uma formulação de bebida orgânica mista, composta por chá branco (*Camellia sinensis* var *sinensis*), erva mate tostada (*Ilex paraguariensis*) e rooibos vermelho (*Aspalathus linearis*), com os teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante maximizados, avaliaram as bioatividades, em meio químico e biológico. Os estudiosos, então, aplicaram o extrato otimizado liofilizado em um gelado comestível, logo, concluíram que a adição 1 g/100 g do extrato otimizado liofilizado nos gelados comestíveis proporcionou um aumento significativo de compostos antioxidantes, independentemente da proteína adicionada.

Como apresentado no estudo relatado, além das funcionalidades já conhecidas *in vitro* e *in vivo*, extratos ricos em compostos fenólicos estão sendo aplicados em alimentos, com o intuito de elevar a vida útil, diminuir danos oxidativos, assim como, melhorar os aspectos sensoriais, além de possibilitar a entrega de um alimento com aditivos naturais e potencialmente funcional para o consumidor. Assim, o conhecimento dos métodos de extração é de grande importância, para que os compostos fenólicos não sejam afetados, obtendo-se, então, um extrato com propriedades funcionais benéficas à saúde.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Estudar a composição química e propriedades funcionais de óleos e materiais desengordurados de semente de uva bordô (*Vitis labrusca* Bordeaux) e amora-preta (*Rubus fruticosus* L.), considerados rejeitos industriais, bem como otimizar a extração de compostos bioativos hidrofílicos das sementes usando uma abordagem estatística.

Objetivos específicos

- Comparar diferentes métodos de extração sólido líquido (Soxhlet, ultrassom e Bligh-Dyer) na composição de ácidos graxos, fenólicos totais, atividade antioxidante química, citotoxicidade e atividade antiproliferativa *in vitro*, atividade antimicrobiana dos extratos lipofílicos das sementes de uva e amora;
- Comparar a eficiência de extração de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante das sementes desengorduradas usando soluções hidroalcoólicas;
- Utilizar um delineamento composto central rotacional (DCCR) em conjunto com a função de desejabilidade para otimizar o processo de extração de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante *in vitro* das sementes;
- Caracterizar os extratos otimizados das sementes de uva e amora em relação à composição fenólica individual, capacidade antioxidante química, inibição de peroxidação lipídica *ex vivo*, atividade antimicrobiana e citotóxica/citoprotetora dos extratos.

CAPÍTULO 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA/CITOPROTETORA DE EXTRATOS APOLARES DE SEMENTES DE UVA (*VITIS LABRUSCA* CV. BORDEAUX) E AMORA-PRETA (*RUBUS FRUTICOSUS*)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi comparar a influência do método de extração, composição química, efeitos antimicrobianos, atividade antioxidante e citotoxicidade, em células humanas do extrato apolar de sementes de uva (*Vitis labrusca*) e amora-preta (*Rubus fruticosus*). Soxhlet (Sox), Bligh-Dyer (BD) e ultrassom (US) foram utilizados nas extrações. Para o extrato apolar de sementes de amora-preta, a extração por BD apresentou os maiores valores médios de conteúdo fenólico total, expressos em miligramas de ácido gálico equivalente por 100 mL de extrato apolar de semente - CFT (102,37 mg AGE/100 mL) e maior atividade antioxidante em relação ao radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), expresso em miligramas de ácido galático equivalente por 100 mL de extrato apolar de semente (11,50 mg AAE/100 mL), se comparado com as extrações Sox e US. Resultados semelhantes foram obtidos para os extratos apolares de sementes de uva, em que a extração de BD obteve os maiores valores de CFT (28,61 mg AGE/100 mL) e DPPH (35,36 mg AAE/100 mL). O método de extração teve impacto na composição dos ácidos graxos. Apenas os extratos apolares de semente de amora-preta e de uva, obtidos por Sox, mostraram algum efeito inibitório *in vitro* contra *Escherichia coli* (IAL 2064) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565). Independentemente do método de extração utilizado, os extratos apolares de semente de amora-preta e de uva não diminuíram a viabilidade celular ($IC_{50} > 1.000 \mu\text{g/mL}$) de linhagens cancerígenas e normais, indicando relativa segurança dos extratos. Todos os extratos de sementes diminuíram a geração de espécies reativas de oxigênio nas linhagens celulares. As frações lipídicas das sementes de amora e de uva podem ser utilizadas como antioxidantes, além disso, os métodos de extração utilizados provocam alterações significativas em relação à sua bioatividade, bem como composição química.

Palavras-chave: modelos celulares; antioxidantes; sementes de frutas; ácidos graxos; bioatividade *in vitro*.

Capítulo foi publicado:

JUNIOR, TUFY KABBAS; DE MOURA, CRISTIANE; DO CARMO, MARIANA ARAÚJO VIEIRA; AZEVEDO, LUCIANA; ESMERINO, LUIS ANTÔNIO; TARDIVO, ROSANGELA CAPUANO; KILPELÄINEN, PETRI; GRANATO, DANIEL. *Chemical Composition, Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic/Cytoprotective Activity of Non-Polar Extracts of Grape (Vitis labrusca cv. Bordeaux) and Blackberry (Rubus fruticosus) Seeds*. MOLECULES, v. 26, p. 4057, 2021.

1.1 INTRODUÇÃO

Por sua versatilidade tecnológica, os óleos vegetais são utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética, agronômica, sanitária e de combustíveis. Esses óleos podem ser extraídos de flores, folhas, galhos, troncos, frutas, cascas, sementes e raízes. A extração de óleos vegetais representa uma importante atividade econômica no Brasil e no mundo, sendo os mais representativos, os óleos extraídos de soja (*Glycine max* L. Merrill), palma (*Elaeis guineensis* Jacq.), Arroz (*Oryza sativa* L.), algodão (*Gossypium hirsutum*) e sementes de girassol (*Helianthus annuus*) (VILLELA et al., 2014). Espécies como andiroba (*Carapa guianensis*), buriti (*Mauritia flexu-osa*), copaíba (*Copaifera* sp.), Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), linhaça dourada (*Linum usita-tissimum*), abacate (*Persea americana* cv. Manteiga), romã (*Punica granatum*) e uva (*Vitis labrusca* cv. Bordeaux), também são utilizadas na produção de óleos no Brasil, porém, são menos expressivos, ou seja, aparecem em menor escala (SANTOS et al., 2015).

Os óleos vegetais são utilizados, cada vez mais, por apresentarem uma complexa mistura de compostos (NAZZARO et al., 2013). Algumas classes de compostos, como ácidos graxos, compostos fenólicos, carotenoides, tocoferóis e fitoesteróis, por exemplo, estão presentes em óleos vegetais e são responsáveis por propriedades antioxidantes e efeitos benéficos à saúde (SANTOS et al., 2015; FERNANDES et al., 2015; WANG et al., 2017). Os triacilgliceróis são formados, a partir da combinação de uma molécula de glicerol com três ácidos graxos, juntamente com diacilgliceróis, ácidos graxos livres e fosfolipídios; que são os principais componentes dos óleos vegetais comestíveis (95-98%) (INDELICATO et al., 2017). Além disso, alguns óleos vegetais são fontes de ácidos graxos essenciais, como ácido oleico, linoleico e linolênico (oliva, uva, canola, girassol, milho, soja etc.). Essa composição química pode ser influenciada por fatores, como período de colheita,

condições climáticas, região de cultivo e método de extração, que podem afetar as propriedades funcionais dos óleos (SIDDIQUE et al., 2016).

Estudos têm demonstrado que o consumo de compostos fenólicos está fortemente relacionado à redução do risco de câncer, doenças inflamatórias e doenças cardiovasculares (FERNÁNDEZ-OCHOA et al., 2017). Santos et al. (2018) estudaram extrato metanol/água (90/10 v/v) de óleo de semente de uva (*Vitis labrusca* cv. Bordeaux) obtido por prensagem a frio. Eles demonstraram atividade antioxidante contra o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS). Deolindo et al. (2019) mostraram que extratos hidroetanólicos de sementes de uva (*Vitis labrusca* cv. Bordeaux) têm atividade antioxidante química, baseada no ensaio DPPH, bem como potencial *in vitro* para inibir a atividade do conversor de angiotensina I enzima (ACE-I). Harbeoui et al. (2019) confirmaram a capacidade anti-inflamatória do extrato etanol/água (80/20, v/v) de sementes de uva *Vitis vinifera* usando células RAW 264,7. Esses autores também sugeriram que os diferentes mecanismos envolvidos na atividade anti-inflamatória podem ser decorrentes do sinergismo entre diversos compostos fenólicos, bem como os elementos estruturais específicos dos flavonoides (fração dominante). Estudos do extrato ácido etanol/água (pH 3,2) 7:3 v/v, a partir de óleos de sementes de uva fresca prensados a frio, realizados por Cecchi et al. (2019), demonstraram atividade inibitória *in vitro* contra a PTP-1B (enzima proteína-tirosina fosfatase 1B), uma enzima que é superexpressa no diabetes tipo 2, com valores máximos de inibição (98%) para *Vitis vinifera* cv. Sauvignon Blanc e inibição mínima (40%) para *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon. Esses autores sugeriram que a atividade inibitória era exercida pela fração fenólica isolada desses óleos e que mais estudos seriam necessários para confirmar a ação dos óleos de semente de uva e ajudar a entender o mecanismo por trás dessa atividade.

Micić et al. (2015) analisaram o extrato de hexano de sementes de amora-preta e framboesa, em que identificaram os ácidos graxos essenciais (ácidos oleico, linoleico e linolênico) como os principais compostos. A amora é uma fruta de interesse, pelo alto teor de antocianinas e elagitaninos (ETs) na polpa, além de outros compostos fenólicos, que contribuem para sua alta capacidade antioxidante. A polpa de amora-preta já mostrou atividade protetora contra agentes de estresse oxidativo, endotoxicidade, doenças neurodegenerativas relacionadas à idade, obesidade,

câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (KAUME; HOWARD; DEVAREDDY, 2012; SAUTEBIN et al., 2004; SERRAINO et al., 2003).

Com o objetivo de contribuir para o conhecimento existente sobre a relação entre composição química e atividades biológicas de extratos obtidos de rejeitos da agroindústria, este estudo tem como objetivo examinar o efeito do método de extração (Soxhlet, Bligh-Dyer e ultrassom) sobre os níveis antioxidante, antimicrobiano e propriedades citotóxicas em células normais e cancerosas, bem como a composição química de extratos apolares de sementes de uva (*Vitis labrusca*) e amora-preta (*Rubus fruticosus*).

1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

1.2.1 Reagentes

Reagente Folin-Ciocalteu, isobutanol, quercetina - (95% de pureza), hidróxido de sódio (NaOH), radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), violeta de pirocatecol (3,3', 4-trihidroxifucsona-2 ácido'-sulfônico), 2,4,6-tris (2-piridil)-S-triazina (TPTZ), peróxido de hidrogênio, ácido hienicosanoico (C:21), colesterol, dimetilsulfóxido (DMSO), 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA), cloreto férrico hexa-hidratado, ácido ascórbico e ferrozine 3-(2-piridil)-5,6-di (2-furil)-1,2,4-triazina-5',5'' sal dissódico do ácido dissulfônico) foram obtidos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Sulfato de sódio anidro, *n*-hexano, clorofórmio e metanol foram obtidos na Anhydrol (São Paulo, Brasil). O etanol foi adquirido da Neon (São Paulo, Brasil). As células A549, IMR90, HepG2 e Caco-2 foram obtidas no Cell Bank do Rio de Janeiro, Brasil.

1.2.2 Materiais da Planta

Amora-preta (*Rubus fruticosus*) e uva bordo (*Vitis labrusca* cv. Bordeaux) foram cultivadas em Vacaria, Rio Grande do Sul (29°32'30" S e 50°54'51" W) e Garibaldi, Rio Grande do Sul (29°15'22" S e 51°32'01" W), Brasil. Os frutos (amora e uva), juntamente com as folhas e flores, foram identificados morfológicamente e as exsiccatas do material vegetal foram depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, Brasil, sob os números 22494 e 22495, respectivamente. As sementes de uva foram obtidas diretamente de um produtor de

suco de uva e o material foi secado (35°C/48 h) e moído (peneira Tyler 60 mesh). As sementes de amora-preta foram obtidas manualmente e passaram pelos processos de sanificação, com NaOCl a 100 mg/L por 15 min; lavagem (água corrente); secagem (estufa com circulação de ar - Técnico, Modelo TE-393/1, São Paulo, Brasil - a 35° C por 48 h); moagem (moinho analítico - QUIMIS-6298A21); padronização (peneira Tyler 60 mesh); e armazenamento sob refrigeração.

1.2.3 Procedimento de Extração

Com o objetivo de comparar a composição química e a bioatividade dos extratos, três metodologias foram testadas para a obtenção dos extratos apolares: Soxhlet, Bligh-Dyer e ultrassom.

1.2.4 Extração com Solvente Quente (SOXHLET)

Cinco gramas da amostra moída foram pesados e transferidos para o cartucho de extração. As extrações foram realizadas em períodos de 4-5 horas, em aparelho Soxhlet com *n*-hexano como solvente de extração. A temperatura foi mantida constante no aparelho de extração, dentro da faixa de ebulição do *n*-hexano (68-70° C). O extrato foi evaporado para remover o solvente, através de um evaporador a vácuo (35° C).

1.2.5 Extração usando Método Bligh-Dyer

Para a extração, foram pesados aproximadamente 5,0 g de cada amostra. Em um Erlenmeyer, foram adicionados 20 mL de metanol, 10 mL de clorofórmio e 8 mL de água (volume dependente do teor de umidade da amostra). Após 30 minutos de agitação, foram adicionados mais 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução de sulfato de sódio a 1,0% p/v. A mistura foi agitada novamente, durante 2 minutos. A camada inferior foi removida e, aproximadamente, 1,0 g de sulfato de sódio anidro foi adicionado, para remover vestígios de água, seguido por filtração com papel de filtro qualitativo. O solvente foi removido, com o uso de um evaporador a vácuo.

1.2.6 Extração Assistida por Ultrassom

Um equipamento de ultrassom (Unique, modelo USC-1450A, Brasil), a 130 W, 20 kHz, foi utilizado para extração assistida por ultrassom, em modo pulsante, em seguida, uma amostra de 5,0 g foi pesada e misturada com 100 mL de hexano. Durante o processo de extração, o recipiente foi mantido em banho-maria, controlado por termostato (25° C). Em todos os experimentos, os extratos foram coletados, após 40 minutos. Os extratos resultantes foram evaporados, com o uso de um evaporador a vácuo.

1.2.7 Conteúdo Fenólico Total e Atividade Antioxidante

Após a obtenção dos extratos apolares das sementes, foi realizada a extração líquido-líquido, seguindo os procedimentos descritos por de Santana et al. (2015), com modificações. Para 250 µL de extratos de sementes apolares, uma alíquota de 500 µL de metanol e água, na proporção de 90/10 v/v, foi adicionada aos microtubos de poliestireno, e o conteúdo foi agitado em vórtex por 5 minutos. A fase superior foi coletada e os extratos de sementes apolares foram extraídos novamente. Os extratos foram mantidos a -18° C.

O conteúdo fenólico total foi avaliado pelo ensaio de Folin-Ciocalteu, seguindo a metodologia descrita por Margraf et al. (2015). O CFT foi expresso em miligramas de ácido gálico equivalente por 100 mL de extratos apolares de sementes (mg AGE/100 mL). A captura do radical DPPH foi avaliada em sistema tamponado com pH 6, utilizando as condições experimentais descritas por Santos, Brizola e Granato (2018). A absorbância foi de 525 nm e os dados foram expressos em miligramas de ácido ascórbico equivalente por 100 mL de extratos apolares de sementes (mg AAE/100 mL).

A determinação da capacidade redutora total (CRT) dos extratos foi baseada no método de Folin-Ciocalteu, modificado por Berker et al. (2013). A absorbância foi de 665 nm, em leitor de microplacas (Biotek, modelo Epoch, EUA). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em miligramas de quercetina equivalente por 100 mL de extratos apolares de sementes (mg QE/100 mL).

A capacidade quelante de Fe^{2+} dos extratos foi avaliada, por meio do método colorimétrico, proposto por Carter (1971), adaptado para o leitor de microplacas. A formação do complexo foi calculada pela Eq. (1) e os resultados foram expressos em miligramas de ácido etilenodiamina tetra-acético equivalente por 100 mL de extratos apolares de sementes (mg EDTAE/100 mL).

$$\text{Capacidade quelante de } \text{Fe}^{2+} (\%) = \left(\frac{A_{\text{Amostra}} - A_{\text{Branco}}}{A_{\text{Controle}}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

1.2.8 Composição Química por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa (CG-MS)

Para a análise de GC-MS, cada amostra (1 mL) foi sililada pela adição de 100 μL de piridina, 100 μL de N, O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) e 50 μL de cloreto de trimetilsilil (TMCS). As amostras foram analisadas usando um sistema HP 6890 GC, equipado com um amostrador automático 7683, um detector de massa seletivo 5973 e uma coluna capilar Zebron ZB SemiVolatiles (30 m $\times$ 0,25 mm id; 0,25 μm de espessura de filme). O hélio foi usado como gás de arraste a uma taxa de fluxo de 1,5 mL/min. O ácido heicosanoico (C:21) e o colesterol foram usados como padrões internos.

O GC-MS usou as seguintes condições: temperatura inicial de 150° C; taxa de temperatura 7° C/min para temperatura 230° C e 4° C/min para temperatura 290° C; tempo de espera 15 minutos; temperatura do injetor 280° C e proporção de 1:10; temperatura da interface MS de 300° C; temperatura da fonte de íons de 230° C; e temperatura quadripolar de 150° C. Os resultados foram calculados com o padrão interno e estão na faixa linear do detector MS. A repetibilidade do método, expressa pelo desvio padrão relativo entre as análises, foi inferior a 5%. Os espectros de massa foram obtidos por energia de ionização por impacto eletrônico (modo EI) 70 eV entre m/z 50 a 800, seguindo o método descrito por Väisänen et al. (2019).

Os ácidos graxos e fitoesteróis foram identificados usando as bibliotecas de espectrometria de massa NIST14 e Wiley11, bem como a própria biblioteca do laboratório. Os resultados da identificação foram comparados com os tempos de retenção conhecidos dos analitos e foram expressos em miligramas por grama de extrato apolar de semente (mg/mL).

1.2.9 Atividade Antimicrobiana

1.2.9.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos foi avaliada, de acordo com a técnica da placa de microdiluição, utilizando microplacas de 96 poços, adaptada do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014). Os extratos foram testados nas concentrações de 3,33, 1,67, 0,83 e 0,42 µg/L, contra *Escherichia coli* (IAL 2064) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565). Os testes foram padronizados em solução fisiológica estéril, equivalente a 0,5 padrão McFarland. Os controles negativos foram o meio de cultura, e os controles positivos foram o meio de cultura, adicionado ao microrganismo testado. As placas foram incubadas a 35° C, durante 24 h. A atividade antimicrobiana foi calculada pelas diferenças entre a média das leituras de densidade óptica (DO) da amostra e seus espaços em branco (três leituras foram registradas, após agitação a 620 nm). Os valores de inibição foram considerados significativos acima de 30% e $p < 0,05$.

1.2.10 Análise de Citotoxicidade

1.2.10.1 Viabilidade Celular

A viabilidade celular *in vitro* de extratos de sementes de uva e amora-preta foi avaliada em relação às linhagens celulares A549, IMR90, HepG2 e Caco-2, pelo ensaio MTT (GREMSKI et al., 2019). Resumidamente, as células (1×10^4 células/poço) foram semeadas em microplacas de 96 poços e tratadas por 48 horas, com 50, 250, 500 e 1.000 µg/mL de óleos de semente de uva e amora, que foram diluídos em DMSO e Tween 80, em concentração final de 0,35% e 0,0009%, respectivamente, para todos os poços. A densidade óptica (DO) foi medida a 570 nm e a porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle foi calculada usando a fórmula como viabilidade celular (%) = $\left(\frac{DO_{Tratamento} - DO_{Branco}}{DO_{Controle} - DO_{Branco}} \right) \times 100$. Os dados foram usados para calcular valores de IC₅₀ por regressão não linear.

1.2.11 ATividade Antioxidante Celular

O potencial antioxidante intracelular de extratos de sementes de uva e amora-preta contra o induzido por H_2O_2 foi avaliado em linhagens celulares A549, Caco-2, HepG2 (6×10^4 por poço) e IMR90 (2×10^4 por poço). As células foram tratadas com 100, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ de óleos, diluídos em 25 mmol/L DCFH-DA (2',7'-diclorofluorescina diacetato), solução com e sem 15 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 . Em seguida, as células foram incubadas a 37°C , por 1 hora, com os tratamentos e, posteriormente, lavadas com PBS e adicionada solução de H_2O_2 (15 $\mu\text{mol/L}$) para todos os poços. O controle positivo foi tratado com 15 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 e o controle negativo, apenas com meio de cultura. A intensidade de fluorescência foi medida em um comprimento de onda de excitação de 485 nm e em um comprimento de onda de emissão de 538 nm. Os dados foram expressos como porcentagem da intensidade de fluorescência (ZHANG et al., 2019).

1.2.12 Análise Estatística

Os dados experimentais foram apresentados como taxas $\pm$ desvio padrão da amostra. Quando apropriado, a comparação das taxas entre os grupos foi realizada, por meio de análise de variância unifatorial (ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas de Fisher. Para isso, a homocedasticidade de todo o conjunto de dados foi formalmente verificada pelo teste Brown-Forsythe, usando o software TIBCO Statistica 13.3 (TIBCO Software Ltd, EUA).

Para correlacionar a bioatividade com a composição química dos extratos apolares das sementes, foram calculados os coeficientes de correlação. Esta análise ajuda a entender qual composto fenólico é responsável pela(s) propriedade(s) funcional(is) *in vitro* (FIDELIS et al., 2018).

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 Conteúdo Fenólico Total e Atividade Antioxidante

Os dados referentes a CFT, atividade antioxidante e rendimento (%) são apresentados na Tabela 1. Os rendimentos obtidos nas extrações foram os seguintes:

Sox (31,9 e 20,7%); BD (20,0 e 13,3%); e US (12,6 e 7,7%) para semente de uva e amora, respectivamente, em cada técnica utilizada. Para os extratos apolares de sementes de amora-preta, a extração por BD apresentou os maiores valores médios de CFT (102,37 mg AGE/100 mL) e antioxidante em relação ao DPPH (11,50 mg AAE/100 mL). Em relação à capacidade redutora total (CRT), expressa em miligramas de quercetina equivalente (QE) por 100 mL de extratos de sementes apolares, dos extratos de sementes de amora-preta, a extração com BD (46,42 mg QE/100 mL) também apresentou o maior valor médio ($p < 0,05$) em relação às demais extrações (não detectadas). Para a capacidade de quelar Fe^{2+} , expressa em miligramas de ácido etilenodiamina tetra-acético equivalente (EDTAE) por 100 mL de extratos de sementes apolares, os maiores valores médios foram encontrados, usando extração por Sox e US, (261,12 mg EDTAE/100 mL) e (77,57 mg EDTAE/100 mL), respectivamente, para o extrato de amora-preta. Para o extrato de uva, a extração BD apresentou os maiores CFT (28,61 mg AGE/100 mL) e DPPH (35,36 mg AAE/100 mL). Os valores aqui apresentados são inferiores aos encontrados por Deolindo et al. (2019), estudando um extrato de semente de uva Bordeaux, obtido com etanol/água (CFT = 3.886 ± 124 mg AGE/100 g, DPPH = 12.872 ± 64 mg AAE/100 g). A capacidade de quelar Fe^{2+} (extrato de uva) apresentou maiores valores com extração de Sox (155,01 mg EDTAE/100 mL) e US (74,70 mg EDTAE/100 mL), diferindo apenas em relação à atividade de CRT, que apresentou maior atividade com extração por US.

Tabela 1 - Conteúdo fenólico total e atividade antioxidante de extratos apolares de sementes de amora-preta e uva.

(continua)

	Extrato apolar de semente de amora			
	Sox	BD	US	P-valor
CFT (mg AGE/100 mL)	7,37 $\pm$ 0,25	102,37 $\pm$ 4,38	7,31 $\pm$ 0,30	<0,001
DPPH (mg AAE/100 mL)	6,91 $\pm$ 0,10	11,50 $\pm$ 0,44	2,07 $\pm$ 0,13	<0,001

Tabela 1 - Conteúdo fenólico total e atividade antioxidante de extratos apolares de sementes de amora-preta e uva.

(conclusão)				
CRT (mg QE/100 mL)	ND	46,42±1,64	ND	<0,001
Capacidade de quelação de Fe²⁺ (mg EDTAE/100 mL)	261,12±12,13	17,12±0,43	77,57±0,12	<0,001
Rendimento (%)	20,7	13,3	7,7	
Extrato apolar de semente de uva				
	Sox	BD	US	P-value
CFT (mg AGE/100 mL)	7,21±0,18	28,61±0,50	7,01±0,29	<0,001
DPPH (mg AAE/100 mL)	6,18±0,39	35,36±0,99	3,95±0,20	<0,001
CRT (mg QE/100 mL)	ND	19,36±0,34	125,89±1,60	<0,001
Capacidade de quelação de Fe²⁺ (mg EDTAE/100 mL)	155,01±1,20	18,62±0,13	74,70±0,60	<0,001
Rendimento (%)	31,9	20,0	12,6	

Nota: Sox=Soxhlet, BD=Bligh-Dyer, US=ultrassom, AGE=ácido gálico equivalente, AAE=ácido ascórbico equivalente, QE=quercetina equivalente, EDTAE=ácido etilenodiamina tetraacético equivalente, ND=não detectado, CFT=conteúdo fenólico total, CRT=capacidade de redução total.
Fonte: O autor.

1.3.2 Composição de Ácidos Graxos e Fitoesteróis

O conteúdo individual de ácidos graxos e fitoesteróis de extratos apolares de sementes de amora-preta e uva é mostrado na Tabela 2. Existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os três métodos de extração: exceto para ácido palmítico ($p = 0,8746$), ácido linolênico ($p = 0,7702$), ácido linoleico ($p = 0,7155$), ácido oleico ($p = 0,2824$), ácido esteárico ($p = 0,0605$) e ácido araquídico ($p = 0,0524$), para os extratos apolares de sementes de amora e éster etílico linoleico ($p = 0,0872$), monopalmitina ($p = 0,1725$), para os extratos apolares de sementes de uva. A amora-preta, extraída com US, teve os níveis mais elevados ($p < 0,001$) de β -sitosterol, β -amirenol e metileno cicloar-tenol, enquanto que para extratos apolares de sementes de uva, os maiores teores foram ácido araquídico, ácido 9-octadecanoico, campesterol, estigmasterol e β -sitosterol.

Proporção de ácido linoleico (18:2) 42-52% em ácidos graxos de extratos de sementes de uva foram menores do que aqueles relatados na literatura para óleo de semente de uva (*Vitis* sp.): 63-75% (CREWS et al., 2006) e 66-75% (LUTTERODT et al., 2011). A proporção de ácido oleico (18:1) foi de 29-37%, ácido palmítico (16:0) 10-14%, ácido esteárico (18:0) 3-5%, ácido linolênico 2-4% (18:3) e ácido araquídico 1-3% de ácidos graxos em extratos.

As proporções de ácidos graxos dos extratos de amora-preta foram 44-53% linoleico (18:2), 31-42% ácido oleico (18:1), 6-9% de ácido palmítico (16:0), 2-5% de ácido esteárico, 1% de ácido linolênico (18:3) e 1-3% de ácido araquídico (20:0). As proporções dos ácidos linoleicos são menores e os ácidos oleicos maiores do que na literatura (MICIĆ et al., 2015), em que os valores foram de 66% e 13%. As extrações foram feitas com hexano, em diferentes configurações de extração, e em temperatura de extração mais baixa (4° C) do que neste estudo, o que poderia explicar as diferenças nas proporções de ácidos graxos nos extratos.

Tabela 2 - Compostos individuais de ácidos graxos e fitoesteróis de sementes de amora-preta e uva.

(continua)

	Extrato apolar de semente de amora (mg/mL de extrato)			
	Sox	BD	US	P-value
Ácido Palmítico (16:0)	1,00±0,27	1,05±0,14	0,98±0,05	0,8746
Ácido Linolênico (18:3)	0,11±0,02	0,12±0,03	0,12±0,01	0,7702
Ácido Linoleico (18:2)	6,88±2,34	7,89±0,98	7,69±0,87	0,7155
Ácido Oleico (18:1)	4,38±1,69	6,42±1,68	5,31±0,57	0,2824
Ácido Esteárico (18:0)	0,44±0,05	0,61±0,22	0,29±0,02	0,0605
Ácido Araquídico (20:0)	0,25±0,13	0,45±0,06	0,42±0,01	0,0524
Monopalmitina	0,23±0,05 ^a	0,24±0,03 ^a	0,13±0,01 ^b	0,0086*
Monoestearina	0,21±0,06 ^{ab}	0,26±0,01 ^a	0,15±0,01 ^b	0,0255*
Campesterol	0,19±0,01 ^b	0,21±0,00 ^a	0,21±0,01 ^a	0,0370
Estigmasterol	0,27±0,01 ^c	0,36±0,02 ^a	0,32±0,02 ^b	0,0012
β-Sitosterol	3,11±0,05 ^b	3,55±0,06 ^a	3,62±0,05 ^a	<0,0001
β-Amireno	0,21±0,01 ^b	0,22±0,01 ^b	0,26±0,01 ^a	0,0006
Metileno Cicloartenol	0,45±0,02 ^b	0,42±0,02 ^c	0,57±0,01 ^a	<0,0001
	Extrato apolar de semente de uva (mg/mL de extrato)			
	Sox	BD	US	P-value
Ácido Palmítico (16:0)	1,47±0,16 ^b	1,80±0,06 ^a	1,75±0,09 ^a	0,0212
Ácido Linolênico (18:3)	0,38±0,04	0,33±0,01	0,38±0,02	0,0872

Tabela 2 - Compostos individuais de ácidos graxos e fitoesteróis de sementes de amora-preta e uva.

	(conclusão)			
Ácido Linoleico (18:2)	5,17±1,20 ^b	7,05±0,24 ^{ab}	8,19±1,14 ^a	0,0233
Ácido Oleico (18:1)	3,53±0,62 ^b	4,71±0,30 ^{ab}	5,43±1,00 ^a	0,0414
Ácido Esteárico (18:0)	0,38±0,04 ^c	0,66±0,02 ^a	0,51±0,08 ^b	0,0023
Ácido Araquídico (20:0)	0,24±0,02 ^a	0,16±0,01 ^b	0,16±0,02 ^b	0,0009
Monopalmitina	0,09±0,02	0,12±0,01	0,10±0,01	0,1725
Monoestearina	0,03±0,01 ^a	0,05±0,00 ^a	0,03±0,01 ^a	0,0024
Campesterol	0,25±0,01 ^b	0,28±0,02 ^b	0,58±0,09 ^a	0,0004
Estigmasterol	0,24±0,01 ^b	0,29±0,01 ^a	0,22±0,01 ^b	0,0002
β-Sitosterol	1,3±0,02 ^b	1,56±0,01 ^a	1,22±0,03 ^c	<0,0001

Fonte: O autor.

1.3.3 Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi testada contra *Escherichia coli* (IAL 2064) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565). Os resultados mostraram que apenas os extratos apolares de amora-preta e semente de uva obtidos pela extração Sox apresentaram algum efeito inibitório. Os valores de inibição do extrato de amora-preta, em relação à *Escherichia coli* (IAL 2064), foram 99,4, 62,5, 33,8 e 33,4% para as concentrações de 33,3, 1,67, 0,83 e 0,42 µg/L, respectivamente. Para *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565), os valores de inibição do extrato de amora-preta foram 90,7 e 33,3%, para concentrações de 33,3 e 1,67 µg/L, respectivamente. Estudos sobre a capacidade antimicrobiana de extratos apolares de sementes de amora-preta não são relatados na literatura. Weli et al. (2020) estudaram a atividade antibacteriana de extratos de folhas de amora-preta (metanol, hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólicos) e concluíram que eles são eficazes contra vários microrganismos gram-positivos e gram-negativos.

O extrato apolar de semente de uva, obtido por Sox, apresentou inibição contra *Escherichia coli* (IAL 2064) nas concentrações de 33,3, 1,67 e 0,83 µg/L, com valores de 92,7, 49,9 e 34,4% de inibição e contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565), com valores de 85,1 e 36,6% de inibição nas concentrações de 33,3 e 1,67 µg/L, respectivamente.

Um estudo conduzido por Duran et al. (2016) demonstrou o poder antimicrobiano das sementes de uva, usando extratos revestidos com quitosana, para prolongar a vida útil dos morangos frescos. A atividade antimicrobiana do bagaço da uva foi descrita por Leal et al. (2020), e os autores concluíram que os caules das uvas demonstraram atividade antimicrobiana, com alta eficiência contra bactérias gram-positivas, especialmente *S. aureus* e *E. faecalis*.

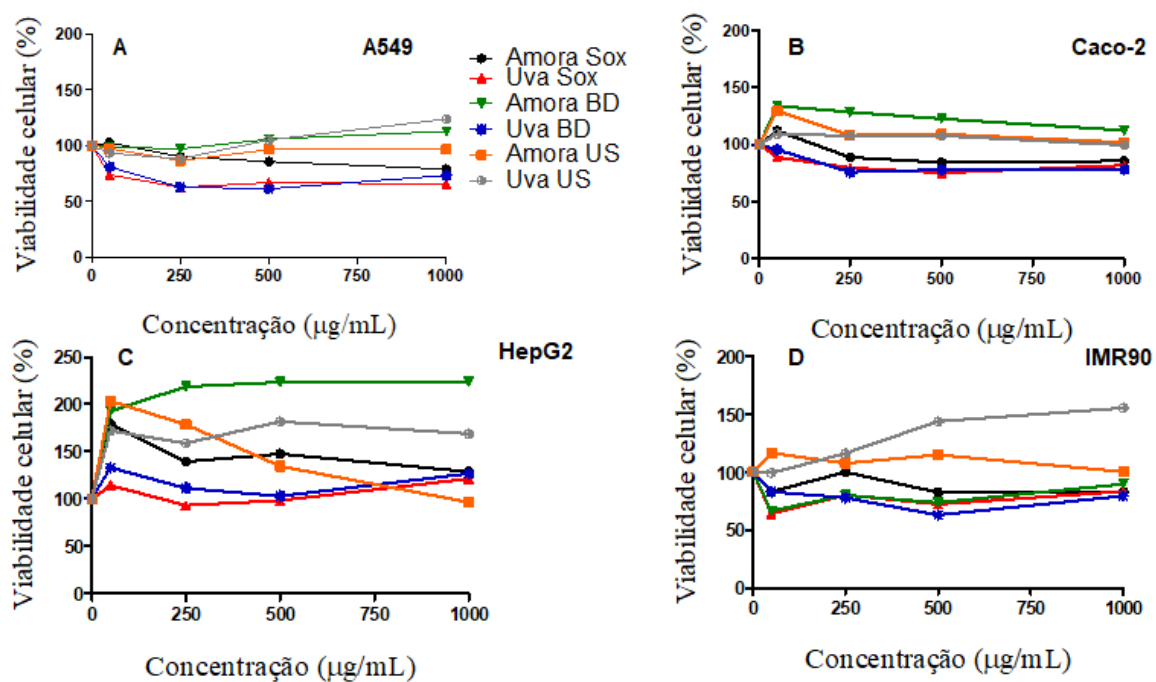
1.3.4 Determinação da Toxicidade Celular dos Extratos Apolares das Sementes e Medição de ERO's (Espécies Reativas de Oxigênio)

Uma faixa de concentrações de extratos apolares de sementes (de 100 a 1.000 µg/mL) foi usada para avaliar a viabilidade celular nas linhas celulares A549, Caco-2, HepG2 e IMR90. Os extratos apolares de sementes de uva e de amoras-pretas, independentemente do método de extração, não diminuíram a viabilidade celular ($IC_{50} > 1.000$ µg/mL) para câncer e linhagens celulares normais (Figura 1). Por outro lado, Montserrat-De La Paz et al. (2015) exibiram que o β -sitosterol isolado, um dos principais ácidos graxos presentes nos extratos apolares de sementes de amora e uva (de 1,22 a 3,66 mg/g), reduziu a viabilidade celular ($IC_{50} = 79,0$ µM), em HT-29 células cancerosas. Levando isso em consideração, é importante considerar que há diferenças entre trabalhar com compostos individuais (β -sitosterol) e matrizes naturais inteiras (isto é, extratos apolares de sementes). Assim, o potencial biológico final nem sempre é a soma de cada um dos compostos individuais presentes nos extratos apolares das sementes, pois diferentes interações podem ocorrer, em meio biológico (MARTINS; BARROS; FERREIRA, 2016).

Em relação à capacidade antioxidante intracelular (Figura 2), os extratos apolares de sementes de amora US e Sox e os extratos apolares de uva, obtidos por US, não foram capazes de induzir a geração de ERO's em todas as linhagens celulares. Quando H₂O₂ foi adicionado, os extratos apolares de sementes diminuíram

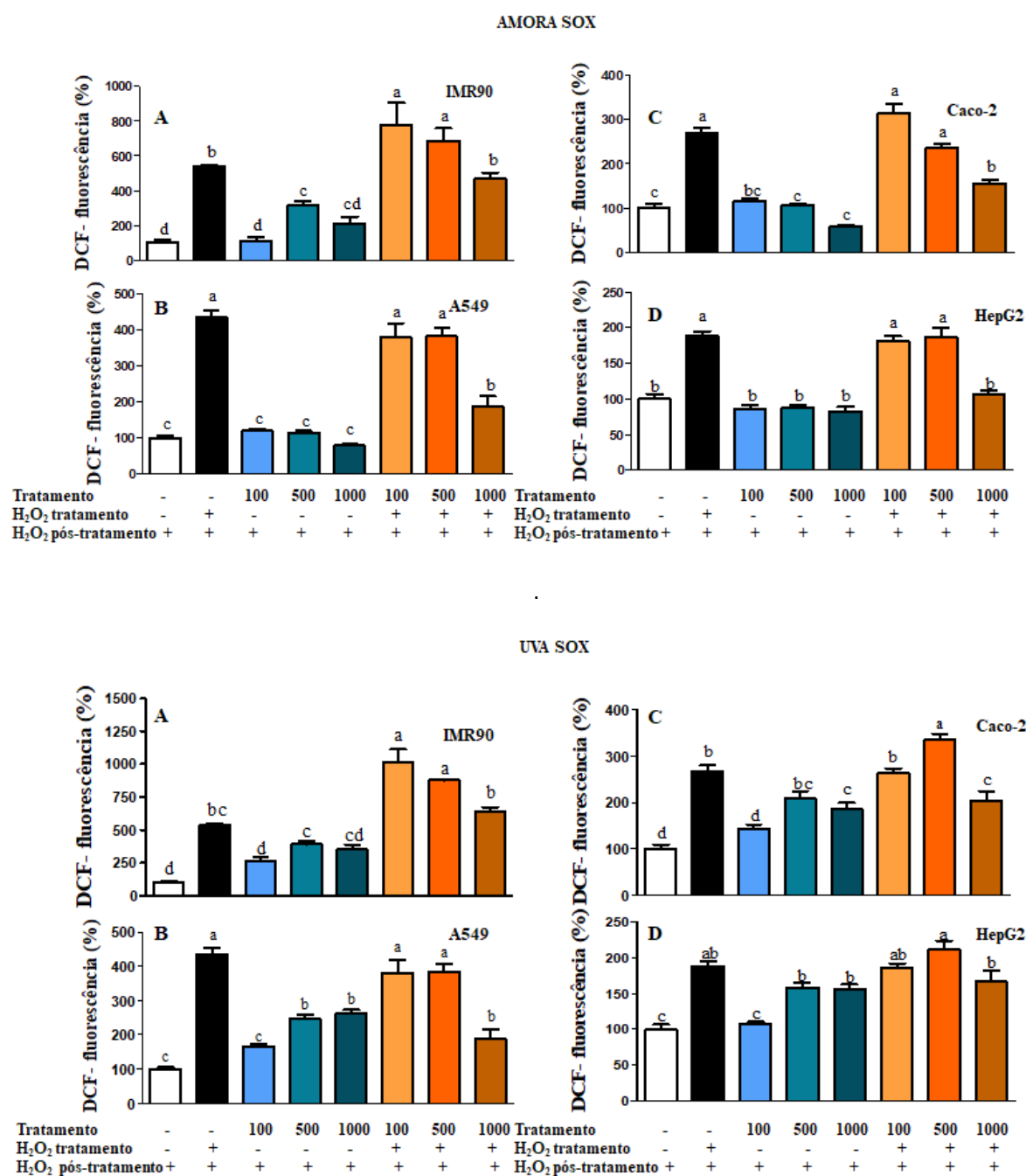
os níveis de ERO's intracelulares e, em alguns casos, a geração de ERO's foi semelhante à do grupo de controle negativo. Em contraste, os extratos apolares de sementes de uva, obtidos por Sox, promoveram um comportamento pró-oxidante, induzindo a produção de ERO's em células cancerosas e normais. Esse achado pode estar associado à atividade antioxidante, medida por métodos químicos, principalmente o ensaio de CRT. Curiosamente, as medidas de CRT não foram detectadas para amora e uva, obtidas por Sox. Em contraste, os extratos apolares de sementes de uva e amora, obtidos pelo método BD, exibiram alta capacidade antioxidante, diminuindo a taxa de ERO's em até 32% ou mantendo seus níveis semelhantes ao controle. Da mesma forma, Atolani et al. (2020) mostraram que os extratos apolares de sementes de *Citrus sinensis* também reduziram a taxa de ERO's, em 50%, quando comparados com o controle negativo (sem adição do agente oxidante). Além disso, Kouba et al. (2018) apontaram que a fração fenólica do azeite de oliva não afetou os níveis de ERO's nas linhas celulares C2C12 e HeLLa, além de HepG2, em que as ERO's diminuíram, significativamente. Assim, no presente estudo, o potencial antioxidante intracelular das sementes de uva e amora foi superior, por meio da extração de BD para as células IMR90, A549, HepG2 e Ca-co-2. Este resultado está de acordo com a maior atividade de eliminação de DPPH ($11,50 \pm 0,44$ e $35,3 \pm 0,99$ mg AAE/100 mL para amora e uva, respectivamente) e conteúdo de CFT ($102,37 \pm 4,38$ e $28,61 \pm 0,5$ mg AGE/100 mL para amora e uva, respectivamente), exibida aqui para o método BD.

Figura 10 - Viabilidade celular representativa de células A549 (A) Caco-2 (B), HepG2 (C) e IMR90 (D), após 48 h de exposição a extratos apolares de sementes de amora-preta e uva.

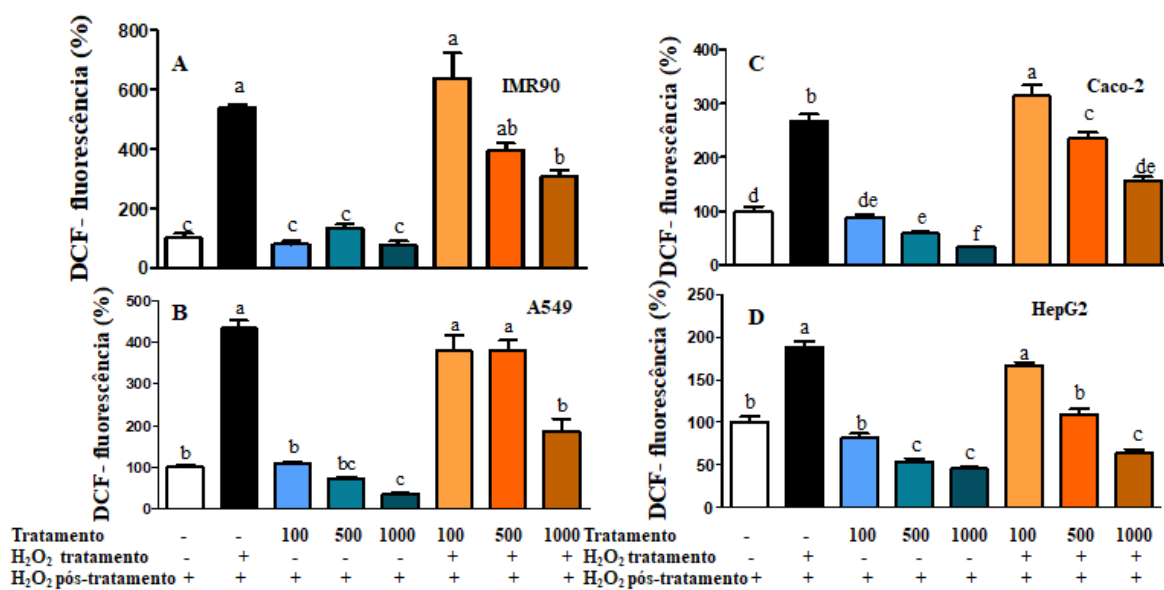


Fonte: O autor.

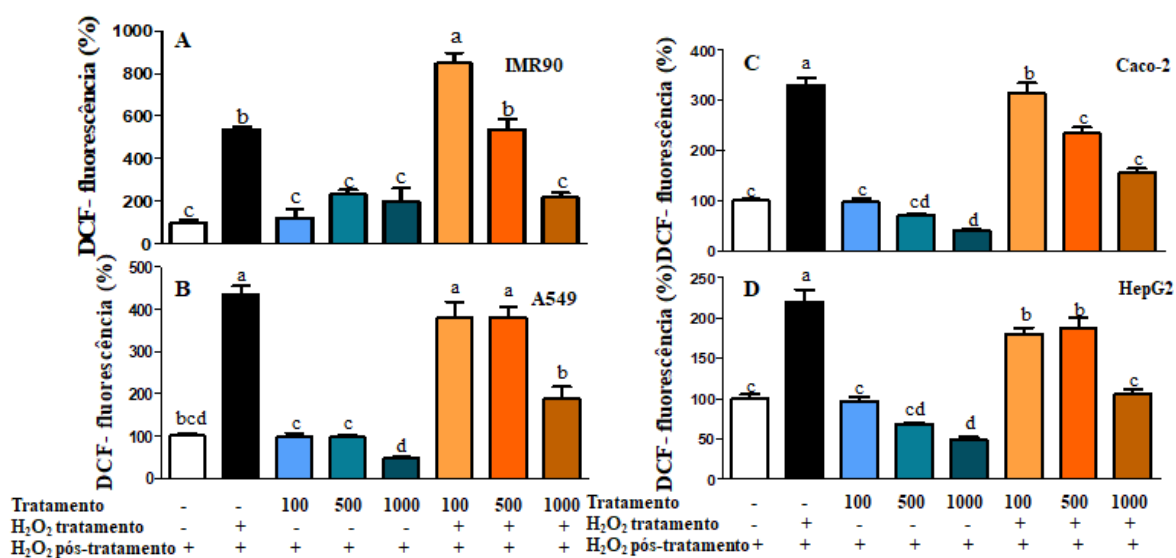
Figura 11 - Resultados da medição de ERO's intracelular em células IMR90 (A), A549 (B), Caco-2 (C) e HepG2 (D) por espectrofluorimetria. Tratamento = extratos de sementes apolares de amora-preta e uva a 100 - 1.000 µg/mL.



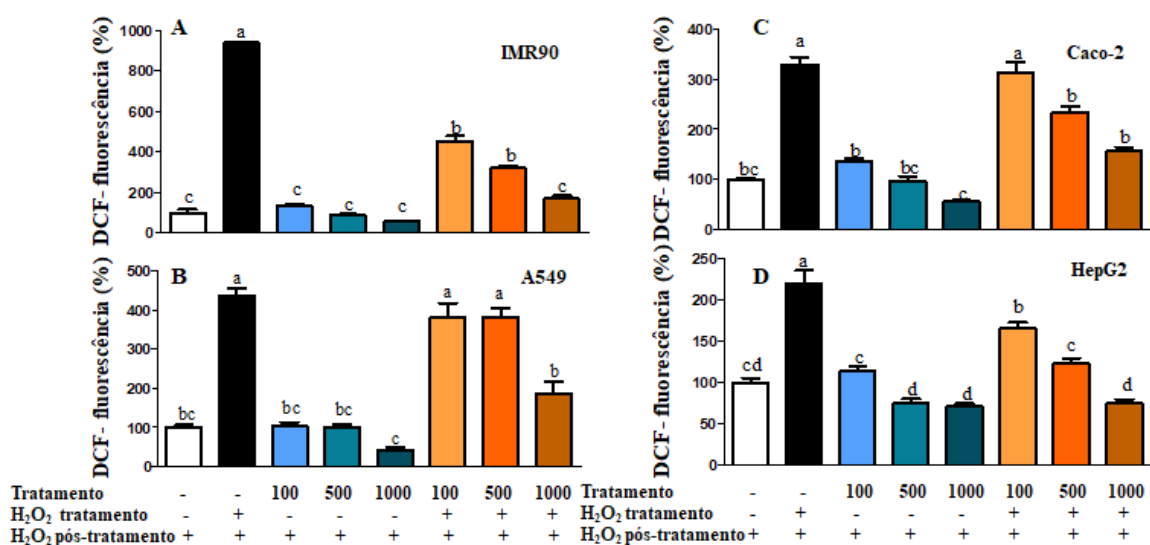
AMORA BD



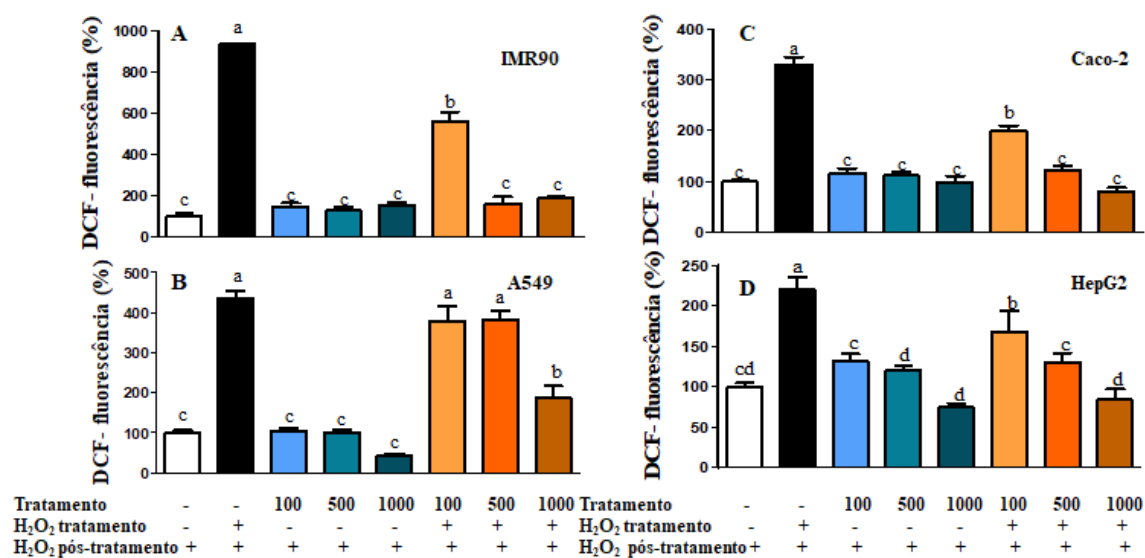
UVA BD



AMORA US



UVA US



Fonte: O autor.

1.4 CONCLUSÕES

Os extratos apolares de sementes, obtidos pelo método BD, apresentaram os maiores níveis de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, tanto para amora quanto para uva, entretanto, apenas os extratos obtidos por Sox apresentaram

efeito inibitório contra *Escherichia coli* (IAL 2064) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565). Quanto à viabilidade celular, os extratos apolares não apresentaram citotoxicidade ou efeito antiproliferativo nas diferentes linhagens celulares, o que mostra sua relativa segurança toxicológica. Assim, considerando os requisitos da Agenda 2030 e a necessidade de formas sustentáveis de produção de ingredientes alimentícios, concluímos que sementes de uva e amora podem ser utilizadas como fontes de antioxidantes lipídicos, derivados em diferentes aplicações tecnológicas.

CAPÍTULO 2 - OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO QUÍMICA VERDE DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE SEMENTES DE UVA (*VITIS LABRUSCA* L.) E AMORA (*RUBUS FRUTICOSUS* L.) COM AVALIAÇÕES CONCOMITANTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA E ANTIOXIDANTE

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar a composição fenólica, atividade antioxidante química e celular, citotoxicidade em células humanas e inibição peroxidativa da fração desengordurada de sementes de uva (*Vitis labrusca*) e amora-preta (*Rubus fruticosus*). Soxhlet (Sox) foi usado na extração e obtenção do material desengordurado. Um estudo de otimização estatística foi utilizado para maximizar a extração de compostos bioativos e a atividade antioxidante da semente desengordurada de uva e amora. Otimização simultânea foi aplicada, e uma combinação de 35,9 minutos de extração e relação massa-solvente de 1 g de semente desengordurada de uva para 61,28 mL de solvente extrator (Etanol 60%) e 62,1 minutos de extração e relação massa-solvente de 1 g de semente desengordurada de amora para 64,1 mL de solvente extrator (etanol 60%). As células cancerígenas HepG2 pareceram ser mais sensíveis aos extratos de uva e amora, enquanto as células híbridas Ea.hy926 mostraram maior resistência aos seus efeitos, no ensaio de viabilidade celular. Em geral, os extratos apresentaram baixa/nenhuma citotoxicidade e, além disso, exibiram um efeito protetor contra a produção de ERO's induzida por H₂O₂, demonstrou atividade antioxidante e efeito protetor sobre os eritrócitos, quando submetidos a condições hipotônicas e isotônicas, além de não apresentar comportamento hemolítico (5.0 to 10.0 µg GAE/mL). Assim, os resultados fornecem uma ampla avaliação da bioatividade de extratos obtidos por um processo simples e de baixo custo, com o uso de solventes atóxicos, com potencial para serem utilizados em aplicações tecnológicas.

Palavras-chaves: Uva; amora; sementes; compostos fenólicos; bioatividade; alimentos funcionais.

Capítulo publicado:

JUNIOR, T.K.; DE MOURA, C.; CRUZ, T.M.; MARQUES, M.B.; CARMO, M.A.V.D.; DEOLINDO, C.T.P.; DAGUER, H.; AZEVEDO, L.; GRANATO, D.

Optimization of the Green Chemistry-like Extraction of Phenolic Compounds from Grape (Vitis labrusca L.) and Blackberry (Rubus fruticosus L.) Seeds with Concomitant Biological and Antioxidant Activity Assessments. Plants 2023, 12, 2618

2.1 INTRODUÇÃO

A atividade agroindustrial gera milhões de toneladas de subprodutos e resíduos vegetais, que poderiam ser explorados ao reingressar na cadeia produtiva, a fim de diminuir seu impacto ambiental e ganhar valor adicional nos processos (ZACHAROF, 2017). Isso é alcançado pelo conceito de biorrefinaria, no qual cada componente da cadeia produtiva é considerado um produto potencial. Além disso, os bioativos encontrados em biomassas têm muitas aplicações potenciais, como nutracêuticos, devido à possibilidade de diminuição de risco de doenças (PRASAD et al., 2015).

Na produção do vinho ocorre a geração de grandes quantidades de resíduos, cerca de 20% em peso (sementes de uva), que são cada vez mais utilizadas na recuperação de óleos essenciais, compostos fenólicos e fibras, sendo uma estratégia sustentável de gestão de resíduos. Além disso, sua reutilização evita problemas decorrentes da sua eliminação e, com isso, é possível avançar para uma era de bioeconomia circular (FILIPPI et al., 2021; GÓMEZ-MEJÍA et al., 2021; İŞÇİMEN; HAYTA, 2021; SILVA; POGAČNIK, 2020).

Estudos realizados por Gómez-Mejía et al. (2022) demonstraram que as sementes de uva, após a extração da fração oleosa, contêm catequina, ácido gálico e quercetina, além de apresentarem atividade antioxidante, o que tem gerado sua utilização para fins tecnológicos. Entretanto, muitos dos estudos estão ligados ao uso de solventes orgânicos potencialmente tóxicos, como o metanol e HCl (MONTEIRO et al. 2020). Assim, torna-se imprescindível a geração de tecnologia, por meio da produção de extratos por green chemistry methods, para a produção de extratos das sementes de uva, como produtos potenciais para a indústria alimentícia e farmacêutica.

As sementes de amora são consideradas agro-resíduos, pois, nas indústrias de processamento de bagas, as sementes, geralmente, são descartadas (20% em peso). Pap et al. (2021), em sua revisão com vários tipos de bagas, entre elas a amora, evidenciam que o extrato aquoso de bagas (polpa mais sementes) de amora

apresentaram atividade antioxidante, hipertensiva, anti-hiperglicêmica e anti-inflamatório *in vitro*. Junior et al. (2021), em seus estudos sobre o extrato apolar (hexano) de semente de amora, demonstraram atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana, ainda, sugeriram a possibilidade de se utilizar as sementes de amora como fonte de antioxidante lipídico. Poucos estudos foram realizados sobre a semente de amora e menos ainda sobre sua semente desengordurada.

Tão importante quanto a composição química e a reutilização de sub-produtos de amora e uva, é a utilização de solventes não tóxicos na extração dos compostos bioativos desses rejeitos, para a possível utilização dos extratos na indústria alimentícia. O uso de solventes, aprovados pelas agências reguladoras, como a EFSA (*European Food Safety Authority*), é de grande importância na obtenção de extratos passíveis de utilização na produção de alimentos com propriedades bioativas. Deolindo et al. (2019) estudaram o extrato de sementes de uva Bordeaux (etanol 60%) e o utilizaram para a produção de queijo *Petit Suisse*, fonte de compostos fenólicos. Karnopp et al. (2017) estudaram o extrato de casca de sementes de uva Bordeaux (etanol 70%), para a formulação de iogurtes funcionais, com atividade antioxidante.

Na tentativa de contribuir com o conhecimento sobre a associação entre a composição química e a atividade biológica de extratos obtidos de rejeitos agroindustriais, este estudo tem por objetivo otimizar um sistema de extração de compostos bioativos de semente de uva (*Vitis labrusca*) e amora-preta (*Rubus fruticosus*) e avaliar sua bioatividade, em sistemas químico e biológico *in vitro*.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Reagentes Químicos e Células

Reagente de Folin-Ciocalteu, isobutanol, quercetina – (pureza de 95%), Hidróxido de sódio (NaOH), 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo radical (DPPH), violeta de pirocatecol (ácido 3,3', 4-tri-hidroxifuchsona-2'-ácido sulfônico), 2,4,6-tris (2-piridil)-S-triazina (TPTZ), peróxido de hidrogênio, ácido heneicosanoico (C:21), colestrol, dimetil sulfóxido (DMSO), 2',7'- diacetato de diclorofluorescina (DCFH-DA), cloreto férrico hexahidratado, ácido ascórbico e ferrozina 3-(2-piridil)-5,6-di(2-furil)-1,2,4-triazina-5',5''-sal dissódico do ácido dissulfônico) foram obtidos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Sulfato de sódio anidro, n-hexano, clorofórmio e álcool metílico foram obtidos

da Anidrol (São Paulo, Brasil). O álcool etílico foi adquirido da Neon (São Paulo, Brasil). A549, IMR90, HepG2, e Caco-2 were obtained at the Cell bank of Rio de Janeiro/Rio de Janeiro, Brazil.

2.2.2 Material Vegetal

Amora-preta (*Rubus fruticosus*) e uva bordô (*Vitis labrusca* cv. Bordeaux) foram cultivadas em Vacaria, Rio Grande do Sul (29°32'30"S e 50°54'51"W) e Garibaldi, Rio Grande do Sul (29° 15' 22"S e 51° 32' 01"W). Os frutos, juntamente com as folhas e flores, foram identificados, morfologicamente, pela Prof^a. Rosângela Capuano Tardivo, e exsiccatas do material vegetal foram depositadas no herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob registros 22494 e 22495, respectivamente. As sementes foram obtidas, manualmente, e passaram pelos processos de sanitização NaOCl a 100 mg/L, por 15 minutos, lavagem (água corrente), secagem (estufa com circulação de ar - Tecnical, Modelo TE-393/1, São Paulo, Brasil), 35°C por 48 horas, moagem (moinho analítico - QUIMIS-6298A21), padronização (peneira Tyler mesh 60) e armazenamento sob refrigeração.

2.2.3 Obtenção dos Extratos Hidroalcoólicos e Otimização da Extração

Para o desengorduramento das sementes, foram pesados 5,0 g de sementes moídas e transferidos para o cartucho de extração. As extrações foram realizadas, em períodos de 4 a 5 horas, em aparelho Soxhlet com *n*-hexano como solvente de extração. A temperatura mantida constante no aparelho extrator, dentro da faixa de ebulição do *n*-hexano (68-70 °C). O material desengordurado foi removido do cartucho e secado, em estufa a 35 °C por 2 horas e armazenado em refrigerador (5 °C), até a extração da fração fenólica, realizada em *eppendorf*, sob agitação em vórtex com etanol 60%.

Um planejamento composto central rotacional com dois fatores foi utilizado para cada material vegetal, no intuito de verificar a influência do tempo de extração e da razão massa/volume no teor de fenólicos totais e atividade antioxidante química. Para isso, um total de 11 ensaios foram testados, de forma aleatória (Apêndice 2), apresentando valores de tempo de extração mínimos de 35.9 minutos e máximo de

64.1 minutos, e razão mínima de massa/volume de 1:35.9 g/mL e máxima de 1:64.1 g/mL. A metodologia de regressão linear múltipla foi utilizada, seguindo as recomendações e procedimentos descritos por Granato et al. (2014).

Os modelos matemáticos propostos incluíram apenas os coeficientes de regressão com significância ($p < 0,05$) e a qualidade dos modelos foi avaliada pelo coeficiente de determinação (R^2), R^2 ajustado e os resíduos analisados pelo teste de Shapiro-Wilk. Usando a RSM, foi possível obter modelos de regressão para descrever cada propriedade funcional e composto químico extraído em função do tempo e da razão amostra/solvente. Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão combinado. Para comparar as variáveis de resposta, inicialmente, foram checadas a normalidade e a homoscedasticidade dos dados pelos testes de Shapiro-Wilk e Brown-Forsythe, respectivamente, sendo que as diferenças entre os valores médios foram avaliadas pela análise de variâncias (ANOVA) unifatorial, seguida do teste de Fisher. P-valores abaixo de 5% foram considerados para rejeição da hipótese nula. O software TIBCO Statistica 13.3 (TIBCO Statistica Ltd, EUA) foi usado em todas as análises estatísticas.

2.2.4 Composição Fenólica por LC-MS/MS e Espectrofotometria UV-VIS

Os CFT foram avaliados, por meio do ensaio Prussian Blue (MARGRAF et al., 2015), e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por 100 g de amostra (mg AGE/100 g). O conteúdo de flavonoides totais (CFT) das amostras foram determinados, por meio do ensaio colorimétrico de cloreto de alumínio, descrito por Aguiar et al. (2020) e os resultados foram expressos em mg de equivalente de catequina por 100 g de amostra (mg CE/100 g). O conteúdo ortodifenólico total (COT) foi determinado, usando o ensaio de molibdato de sódio (MAESTRO DURAN et al., 1991), e os resultados foram expressos em mg de ácido clorogênico equivalente por 100 g (mg CAE/100 g). O conteúdo de taninos condensados totais (TCT) foram determinados, usando o ensaio de vanilina- H_2SO_4 e os resultados foram expressos como (mg CTE/100 g).

No total, 21 compostos fenólicos dos extratos foram determinados, individualmente, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS), de acordo com o método descrito por Seraglio et al. (2016). A análise LC-

MS/MS foi realizada com solventes de grau cromatográfico e água ultrapura (resistividade mínima 18,3 MΩ cm). As análises foram realizadas no cromatógrafo ExionLC, acoplado ao espectrômetro de massas QTRAP 5500, ambos fornecidos pela AB Sciex LLC (Framingham, EUA). O equipamento LC-MS/MS foi utilizado com uma fonte de ionização por eletrospray e o modo de monitoramento de múltiplas reações (MMR). O software Analyst 1.6.2 (AB Sciex, Foster City, CA) e MultiQuant (AB Sciex, Foster City, CA) foram usados para operação do instrumento e do processamento de dados, respectivamente.

A separação cromatográfica foi realizada no modo de fase reversa, com uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (3,5 µm, 3,0 x 100 mm), fabricada pela Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, EUA). O forno da coluna foi mantido a 40 °C; o volume de injeção da amostra foi de 5 µL e a taxa de fluxo da fase móvel foi ajustada para 300 µL/min. A cromatografia líquida foi realizada em eluição gradiente, da seguinte forma: 98% A (0–3 min), 80% A (3–10 min), 10% A (10–11 min), 98% A (11–13 min), mais 4 minutos para autoequilíbrio do sistema. A fase móvel A foi composta por uma solução aquosa de ácido fórmico (0,1%) e a fase móvel B foi composta por acetonitrila, com 0,1% de ácido fórmico. Cada amostra foi injetada em triplicata, e a quantificação de cada composto fenólico foi realizada por calibração de padrão externo na faixa linear de 25-1000 µg/L, exceto para EGCG, cuja faixa linear foi de 500-1000 µg/L, e linearidade (R^2) acima de 0,99. Os limites de quantificação variaram de 0,20 a 12,8 µg/L, e a descrição da validação do método já está disponível (SERAGLIO et al., 2016). Os modos de ionização positivo e negativo foram ajustados para 5500 V e -4500 V, respectivamente; outros parâmetros do instrumento foram ajustados para 25 psi (gás de cortina) e 55 psi (gás nebulizador e gás auxiliar), a 400 °C, em uma atmosfera de nitrogênio. Os parâmetros de espectrometria de massa para a análise de cada composto fenólico são apresentados no Apêndice 3. Os resultados foram expressos em mg de cada composto fenólico por 100 g de extrato (mg/100 g).

2.2.5 Atividade Antioxidante

Para a avaliação da atividade antioxidante (AA) foram utilizados ensaios, que abrangem mecanismos distintos de ação. De acordo os métodos propostos por Santos; Brizola; Granato (2017), a AA foi avaliada pela capacidade quelante de Fe^{2+} ,

os resultados foram expressos em mg de EDTA equivalente (mg EDTAE/100 g de amostra), captura do radical livre DPPH e atividade antioxidante de redução do ferro (FRAP), para ambas as análises, os resultados expressos em mg de ácido ascórbico equivalente (mg AAE/100 g de amostra). A porcentagem de inibição da peroxidação lipídica induzida por Fe^{2+} de fosfolipídios e triacilgliceróis contidos na gema de ovo de galinha, em sistema tamponado (pH 7,4), resultado expresso em mg QE/100 g de amostra, foi realizada, utilizando os métodos propostos por Margraf et al. (2016). A capacidade de capturar radicais $\cdot\text{OH}$ foi determinada na presença de ácido salicílico (XIONG et al., 2011). A taxa de inibição do radical hidroxila foi calculada pela seguinte equação:

$$\% \text{Inibição} = \left(\frac{A_{\text{Amostra}} - A_{\text{Branco}}}{A_{\text{Controle}} - A_{\text{Branco}}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

2.2.6 Perfil de Toxicidade e Atividade Antioxidante Baseada em Células

Para avaliar a citotoxicidade *in vitro* do extrato, a coloração com sal de tetrazólio foi utilizada para avaliar o efeito do extrato na viabilidade celular pelos parâmetros IC_{50} , GI_{50} e CL_{50} , conforme descrito anteriormente, por Carmo et al. (2019). A549 (células epiteliais de adenocarcinoma pulmonar); HepG2 (células de carcinoma de hepatoma humano), HCT8 (carcinoma de cólon humano) e EA.hy926 (híbrido de célula endotelial) foram semeados a 1×10^4 células/poço e foram tratados com extratos por 48 horas, usando as seguintes concentrações: 50, 100, 150, 200, 250 e 500 μg QE/ml. Em seguida, adicionou-se solução de MTT (5 mg/mL) e, após 4 horas, o formazan insolúvel produzido foi dissolvido em 100 μL de DMSO. A absorbância (570 nm) foi medida, usando um leitor de microplacas (Synergy™ H1, Biotek), e a análise de dose-resposta foi determinada por regressão não linear (ajuste de curva).

A geração de espécies reativas de oxigênio (ERO's) é usada para monitorar a oxidação em sistemas biológicos. As quantidades intracelulares de ERO's foram medidas por um ensaio fluorimétrico, com diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH-DA), que detecta e quantifica a produção intracelular de radical superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio (OTHMÈNE et al., 2021). Todas as linhagens celulares foram semeadas a 6×10^4 /poço e tratadas por 1 hora a 37 °C, com extratos diluídos em solução de DCFH-DA (25 mmol/L) nas concentrações de 10, 50 e 100 μg

QE/mL. As células foram tratadas com 15 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 para o controle positivo e para o controle negativo; apenas com meio de cultura. Após a incubação, a produção intracelular de ERO's foi medida por detecção fluorimétrica da oxidação do DCF, em um fluorímetro (Synergy TM H1, Biotek) com comprimento de onda de excitação de 485 nm e comprimento de onda de emissão de 538 nm (GRANATO et al., 2022). A intensidade da fluorescência do DCF é proporcional à quantidade de ERO's formada intracelularmente.

2.2.7 Efeito Anti-Hemolítico *in vitro*

A atividade anti-hemolítica, sob condições hipotônicas, foi avaliada com eritrócitos isolados de amostras de sangue O⁺, obtidas do Hospital Universitário Regional Wallace Thadeu de Mello e Silva. Os ensaios foram realizados, de acordo com Migliorini et al. (2019), com hematócrito 0,8%, [NaCl] = 0,1%, 0,4% e 0,8% (p/v) e o extrato concentrado a 5,0, 7,5 e 10,0 $\mu\text{g AGE/mL}$, e a taxa de hemólise foi medida pela absorbância a 540 nm. A oxidação da hemoglobina foi realizada pela medida de absorbância em 630 nm (MORABITO et al., 2017). Todo o procedimento experimental foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CAAE 94830318.1.0000.0105).

2.2.8 Análise Estatística

Os dados experimentais foram apresentados como médias $\pm$ desvio padrão amostral. Quando apropriado, a comparação de médias entre os grupos foi realizada, por análise de variâncias unifatorial (ANOVA), seguida pelo teste de comparação múltipla de Fisher. Para isso, a homocedasticidade de todo o conjunto de dados foi formalmente verificada pelo teste de Brown-Forsythe, usando o software TIBCO Statistica 13.3 (TIBCO Statistica Ltd, EUA).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Efeito do Tempo de Extração e Razão Sólido-Solvente na Composição Fenólica Total e Atividade Antioxidante

Os valores médios de CFT, atividade antioxidante, flavonoides, taninos e *orto*-difenóis estão apresentados na Tabela 3 (uva) e Tabela 4 (amora). Foi observada uma diferença significativa em todas as respostas ($p < 0,05$). O teor de CFT variou de 2747 a 3623 mg AGE/100 g para a semente desengordurada de uva e 923 a 1243 mg AGE/100 g para a semente desengordurada de amora. O maior ($p < 0,05$) teor de CFT foi obtido com tempo de extração de 35,9 minutos e razão sólido-solvente de 1:50 x/s para a semente de uva, não apresentando diferença significativa em relação à extração com tempo de 40 minutos e razão sólido-solvente de 1:60 x/s. Para a semente desengordurada de amora, o melhor resultado para CFT foi obtido com 60 minutos de extração e razão sólido-solvente de 1:60 x/s.

A Tabela 5 mostra que o modelo de regressão múltipla (e.g., RSM, Tabela 6) para CFT explicou 89% da variabilidade dos dados para uva ($R^2_{adj} = 0,888$) e 66% para os dados de amora ($R^2_{adj} = 0,664$), mostrando que o modelo matemático de CFT (uva) poderá ser usado para fins preditivos.

Tabela 3 - Composição química e atividade antioxidante dos extratos de uva em relação ao tempo de extração e razão massa-volume.

Ensaio	Variáveis Independentes (Valores Originais e Codificados)		Fenólicos totais (mg AGE/100 g)	Flavonoides (mg QE/100 g)	Taninos condensados (mg CTE/100 g)	Orto-difenólicos (mg [ACE]/100 g)	DPPH (mg AAE/100 g)	Capacidade quelante de Fe ²⁺ (mg EDTAE/100 g)	FRAP (mg AAE/100 g)
	Tempo (min)	1:X (g/mL)							
1	40 (-1)	1:40 (-1)	2916±7 ^{cde}	62,9±1,7 ^f	3242±95 ^e	554±20 ^e	5870±98 ^{def}	66,1±1,8 ^c	9032±328 ^b
2	40 (-1)	1:60 (1)	3609±24 ^a	78,8±2,8 ^b	3928±315 ^{de}	744±24 ^{bc}	7069±544 ^a	55,5±4,9 ^d	10023±98 ^a
3	60 (1)	1:40 (-1)	2914±61 ^{de}	55,9±2,1 ^g	3885±353 ^{de}	697±40 ^{cd}	5676±250 ^f	45,4±4,1 ^e	7518±241 ^{de}
4	60 (1)	1:60 (1)	2747±117 ^f	74,1±1,6 ^c	4982±438 ^{bc}	700±78 ^{cd}	6173±36 ^{cde}	85,3±5,3 ^a	7294±234 ^e
5	35,9 (-1,41)	1:50 (0)	3623±105 ^a	72,7±3,0 ^{cde}	5561±1092 ^b	963±64 ^a	6650±141 ^{ab}	46,7±2,6 ^e	9596±308 ^a
6	64,1 (1,41)	1:50 (0)	3036±45 ^{bc}	69,4±2,6 ^{de}	5030±538 ^{bc}	801±54 ^b	5832±79 ^{def}	65,1±6,5 ^c	8360±190 ^c
7	50 (0)	1:35,9 (-1,41)	2825±12 ^{ef}	68,5±3,3 ^e	3993±449 ^{de}	892±11 ^a	5517±80 ^f	36,1±2,4 ^f	7807±166 ^d
8	50 (0)	1:64,1 (1,41)	3010±51 ^{bcd}	73,6±3,9 ^{cd}	5695±267 ^{ab}	753±43 ^{bc}	6679±511 ^{ab}	74,2±3,7 ^b	7565±579 ^{de}
9C	50 (0)	1:50 (0)	3087±72 ^b	70,1±2,7 ^{cde}	6384±368 ^a	787±80 ^b	6388±91 ^{bc}	61,4±1,3 ^{cd}	8661±342 ^{bc}
10C	50 (0)	1:50 (0)	3063±100 ^b	69,2±2,3 ^{de}	4547±411 ^{cd}	636±16 ^d	5786±293 ^{ef}	64,2±7,2 ^c	8305±202 ^c
11C	50 (0)	1:50 (0)	2884±89 ^e	84,9±3,0 ^a	4022±128 ^{de}	648±12 ^d	6237±153 ^{bcd}	61,7±2,9 ^{cd}	8660±249 ^{bc}
<i>p</i> -Valor (homocedasticidade)			0,503	0,999	0,942	0,914	0,709	0,954	0,97
<i>p</i> -Valor (one-way ANOVA)			<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Nota: (C)=ponto central; 1:X=1 g de material vegetal para X mL de solvente extrator; CTE=catequina equivalente; AGE=ácido gálico equivalente; QE=quercetina equivalente; AAE=ácido ascórbico equivalente; EDTAE=Ácido etilenodiamino tetra-acético equivalente; ACE=ácido clorogênico equivalente. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Fisher.

Fonte: O autor.

Tabela 4 – Composição química e atividade antioxidante dos extratos de amora em relação ao tempo de extração e razão massa-volume.

Ensaio	Variáveis Independentes (Valores Originais e Codificados)		Fenólicos totais (mg AGE/100 g)	Flavonoides (mg QE/100 g)	Taninos condensados (mg CTE/100 g)	Orto-difenólicos (mg ACE/100 g)	DPPH (mg AAE/100 g)	Capacidade quelante de Fe ²⁺ (mg EDTAE/100 g)	FRAP (mg AAE/100 g)
	Tempo (min)	1:X (g/mL)							
1	40 (-1)	1:40 (-1)	923±11 ^h	46,2±1.6 ^e	579±44 ^f	253±32 ^e	1769±87 ^f	144±8 ^f	3060±53 ^f
2	40 (-1)	1:60 (1)	1167±6 ^g	58,1±1.7 ^{cd}	637±50 ^{ef}	258±3 ^e	2246±197 ^{cde}	227±1 ^a	3823±143 ^d
3	60 (1)	1:40 (-1)	1067±25 ^{cd}	55,9±1.8 ^d	594±42 ^f	350±35 ^{cd}	2152±147 ^{de}	143±4 ^f	3437±92 ^e
4	60 (1)	1:60 (1)	1243±13 ^a	65,7±1.0 ^a	1001±112 ^{ab}	367±13 ^{bcd}	1229±190 ^g	215±9 ^b	4258±148 ^a
5	35,9 (-1,41)	1:50 (0)	1143±9 ^{de}	60,9±0.6 ^b	856±19 ^{cd}	426±66 ^a	2470±173 ^{bc}	186±7 ^c	3893±78 ^{cd}
6	64,1 (1,41)	1:50 (0)	1202±8 ^b	63,8±1.6 ^a	840±40 ^{cd}	409±31 ^{ab}	2366±194 ^{cd}	185±5 ^c	3958±93 ^{bcd}
7	50 (0)	1:35,9 (-1,41)	1073±26 ^g	59,4±1.6 ^{bc}	750±45 ^{de}	420±42 ^{ab}	2098±93 ^e	120±4 ^g	3551±92 ^e
8	50 (0)	1:64,1 (1,41)	1170±21 ^{cd}	60,3±0.4 ^{bc}	1114±141 ^a	326±18 ^d	2760±127 ^a	235±5 ^a	4295±317 ^a
9C	50 (0)	1:50 (0)	1105±20 ^f	58,4±1.4 ^c	872±112 ^{bcd}	382±49 ^{abcd}	2264±78 ^{cde}	175±2 ^d	3951±80 ^{bcd}
10C	50 (0)	1:50 (0)	1187±30 ^{bc}	59,7±1.1 ^{bc}	872±20 ^{bcd}	372±12 ^{abcd}	2706±94 ^{ab}	166±5 ^e	4153±166 ^{ab}
11C	50 (0)	1:50 (0)	1129±10 ^{ef}	61,1±0.9 ^b	926±96 ^{bc}	391±15 ^{abc}	2634±79 ^{ab}	183±3 ^{cd}	4088±209 ^{abc}
<i>p</i> -Valor (homocedasticidade)			0,949	0,976	0,889	0,699	0,948	0,79	0,879
<i>p</i> -Valor (one-way ANOVA)			<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Nota: (C)=ponto central; 1:X=1 g de material vegetal para X mL de solvente extrator; CTE=catequina equivalente; AGE=ácido gálico equivalente; QE=quercetina equivalente; AAE=ácido ascórbico equivalente; EDTAE=Ácido etilenodiamino tetra-acético equivalente; ACE=ácido clorogênico equivalente. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Fisher.

Fonte: O autor.

Tabela 5 – Efeitos do tempo e razão x/s na extração de compostos bioativos e atividade antioxidante de semente de uva (*Vitis labrusca*).

(continua)

Componentes do modelo	Coefficientes de regressão	Erro padrão	t-Valor	p-Valor	-95% Confiança	+95% Confiança
Compostos fenólicos totais						
Média	3012	29,6	102	<0,001	2951	3073
(1) Tempo (min)(L)	-212	18,1	-11,7	<0,001	-249	-175
Tempo (min)(Q)	140	21,6	6,5	<0,001	95,7	185
(2) Razão (x/s)(L)	99	18,1	5,4	<0,001	61,3	136
Razão (x/s)(Q)	-67	21,6	-3,1	0,005	-112	-22,5
1L por 2L	-215	25,6	-8,4	<0,001	-268	-162
R ²	0,905					
R ² ajustado	0,888					
p-valor (normalidade dos resíduos)	0,763					
Capacidade antioxidante (DPPH)						
Média.	6171	52,1	118	<0,001	6064	6279
(1) Tempo (min)(L)	-281	61,2	-4,6	<0,001	-408	-155
(2) Razão (x/s)(L)	418	61,2	6,8	<0,001	292	544
R ²	0,706					
R ² ajustado	0,680					
p-valor (normalidade dos resíduos)	0,945					

Tabela 5 – Efeitos do tempo e razão x/s na extração de compostos bioativos e atividade antioxidante de semente de uva (*Vitis labrusca*).

(conclusão)

Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)						
Média	8542	99,6	85,8	<0,001	8336	8747
(1) Tempo (min)(L)	-751	61,1	-12,3	<0,001	-877	-624
Tempo (min)(Q)	254	72,9	3,5	0,002	103	404
Razão (x/s)(Q)	-396	72,9	-5,4	<0,001	-546	-246
1L por 2L	-304	86,2	-3,5	0,002	-482	-126
R ²	0,795					
R ² ajustado	0,765					
p-valor (normalidade dos resíduos)	0,401					

Fonte: O autor.

Tabela 6 - Efeitos do tempo e razão X/S na extração de compostos bioativos e atividade antioxidante de semente de amora (*Rubus fruticosus*).

(continua)

Componentes do modelo	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t-Valor	p-Valor	-95% Confiança	+95% Confiança
Compostos fenólicos totais						
Média	1145	6,6	173	<0,001	1131	1159
(1) Tempo (min)(L)	38,0	5,6	6,8	<0,001	26,5	49,6
(2) Razão (x/s)(L)	69,7	5,6	12,5	<0,001	58,2	81,2
Razão (x/s)(Q)	-22,6	6,4	-3,5	0,002	-35,8	-9,5
1L por 2L	-17,3	7,9	-2,2	0,038	-33,6	-1,0

Tabela 6 - Efeitos do tempo e razão X/S na extração de compostos bioativos e atividade antioxidante de semente de amora (*Rubus fruticosus*).

(conclusão)

R ²	0,706					
R ² ajustado	0,664					
p-valor (normalidade dos resíduos)	0,648					
Capacidade quelante de Fe²⁺						
Média	177	1,6	110	<0,001	173	180
Tempo (min)(Q)	5,4	1,5	3,5	0,002	2,2	8,6
(2) Razão (x/s)(L)	39,7	1,4	29,3	<0,001	36,9	42,5
R ²	0,965					
R ² ajustado	0,963					
p-valor (normalidade dos resíduos)	0,077					
Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)						
Média	4065	51,6	78,8	<0,001	3959	4171
(1) Tempo (min)(L)	113	31,6	3,6	0,002	47,9	178
Tempo (min)(Q)	-140	37,7	-3,7	0,001	-218	-62,4
(2) Razão (x/s)(L)	330	31,6	10,4	<0,001	265	395
Razão (x/s)(Q)	-142	37,7	-3,8	<0,001	-220	-63,8
R ²	0,719					
R ² ajustado	0,679					
p-valor (normalidade dos resíduos)	0,232					

Fonte: O autor.

Os valores de DPPH e FRAP em relação à semente desengordurada de uva variaram de 5676 a 7069 mg AAE/100 g e de 7294 a 10023 mg AAE/100 g, respectivamente. Para ambas as respostas, a extração realizada com tempo de 40 minutos e razão sólido-solvente 1:60 x/s apresentaram maiores valores médios ($p < 0.05$), não apresentando diferença significativa em relação à extração realizada com tempo de 35,9 e razão 1:50 x/s. Os modelos explicam 68% e 76% da variabilidade dos dados, respectivamente, para DPPH e FRAP ($R^2_{adj} = 0,680$ e $R^2_{adj} = 0,765$). Deolindo et al. (2019), em estudo com semente de uva Bordeaux, apresentaram valores de DPPH e FRAP de 12872 mg AAE/100 g e 7733 mg AAE/100 g, respectivamente, utilizando uma razão 1:50 x/s (etanol 60%), sendo o valor de FRAP próximo ao encontrado neste estudo.

Os valores obtidos para a semente desengordurada de amora, frente à quelatação do Fe^{2+} e FRAP, variaram de 144 a 235 mg EDTA/100 g e 3060 a 4295 mg AAE/100 g, respectivamente. Para ambas as respostas, a extração que apresentou maiores valores médios ($p < 0.05$) foram um tempo de 50 minutos e razão sólido-solvente de 1:64,1 x/s. Os modelos explicam 96% e 68% da variabilidade dos dados para Fe^{2+} e FRAP ($R^2_{adj} = 0,963$ e $R^2_{adj} = 0,679$), respectivamente. Junior et al. (2021), estudando extrato não polar de semente de amora, apresentaram valores de Fe^{2+} de 261 mg EDTA/100 g, valor este também próximo ao encontrado neste estudo.

É importante ressaltar a importância da avaliação da atividade antioxidante por diferentes métodos, pois essa pode ocorrer por três mecanismos: transferência de átomos de hidrogênio; transferência de elétrons; e a capacidade de quelar metais de transição (GRANATO et al., 2018). Os compostos fenólicos são reconhecidos como potenciais antioxidantes, devido à sua facilidade de captura de ERO's, além de íons redutores e quelantes, que podem catalisar a peroxidação lipídica.

No presente estudo, a otimização simultânea, baseada na função de desejabilidade, foi usada para determinar as melhores condições experimentais para obter um alto teor de fenólicos e uma atividade antioxidante significativa (Apêndice 1). Com uma função de desejabilidade (valor d) de 0,899 para semente de uva e 0,892 para semente de amora, foram propostas as seguintes condições experimentais: 35,9 minutos de extração e relação massa-solvente de 1 g de semente desengordurada de uva para 61,28 mL de solvente extrator e, 62,1 minutos de extração e relação massa-solvente de 1 g de semente desengordurada de amora para 64,1 mL de solvente

extrator. Os valores previstos pelos modelos de regressão, juntamente com os valores experimentais e o percentual de erro absoluto, são apresentados na Tabela 7. Os dados experimentais encontram-se dentro das faixas de previsão, comprovando que os modelos eram adequados e capazes de prever a composição fenólica, bem como a atividade antioxidante dos extratos etanólicos de sementes desengorduradas de uva e amora.

Tabela 7 – Valores previstos e experimentais para os extratos otimizados.

	Parâmetros avaliados	Valores médios previstos	-95% Predição	+95% Predição	Valores médios experimentais	Erro relativo (%)
Uva	CFT (mg AGE/100 g)	3847	3625	4068	3623±40	5,8
	FRAP (mg AAE/100 g)	10084	9339	10829	9395±14	6,8
	DPPH (mg AAE/100 g)	6914	6167	7661	7102±164	2,7
Amora	CFT (mg AGE/100 g)	1249	1184	1314	1295±12	3,7
	FRAP (mg AAE/100 g)	4180	3811	4549	3804±45	9,0
	Fe ²⁺ (mg EDTA/100 g)	241	225	256	231±6	4,1

Nota: CFT=compostos fenólicos totais, AGE=ácido gálico equivalente, FRAP=poder antioxidante de redução do ferro, AAE=ácido ascórbico equivalente, EDTAE=ácido etilenodiamina tetra-acético equivalente; DPPH=2,2-difenil-1-picrilhidrazil.

Fonte: O autor.

2.3.2 Composição Química dos Extratos Otimizados e Liofilizados

Os valores da composição química e atividade antioxidante dos extratos otimizados estão representados na Tabela 8. Os teores de flavonoides, taninos condensados e *orto*-difenois para a semente desengordurada de uva foram, respectivamente, 61 ± 0.05 mg QE/100 g, 2609 ± 257 mg CTE/100 g e 729 ± 81 mg ACE/100 g. Já para a semente de amora, os valores foram de 38.1 ± 0.06 mg QE/100 g (flavonoides), 409 ± 154 mg CTE/100 g (taninos), e 233 ± 37 mg ACE/100 g (*orto*-difenois). Deolindo et al. (2019), estudando extrato hidroalcoólico (60% etanol) de semente de uva, apresentaram valores maiores para os compostos em questão, sendo, respectivamente, 6736 ± 276 mg QE/100 g (flavonoides), 10635 ± 753 mg CTE/100 g (taninos), e 1260 ± 9 mg ACE/100 g (*orto*-difenois).

Tabela 8 – Composição química dos extratos otimizados e liofilizados.

	CFT (mg AGE/100 g)	Flavonoides (mg QE/100 g)	Taninos (mg CTE/100 g)	Orto-difenóis (mg ACE/100 g)	DPPH (mg AAE/100 g)	Capacidade quelante de Fe ²⁺ (mg EDTAE/100 g)	FRAP (mg AAE/100 g)	Captura de radical OH· (mg AAE/100 g)	Inibição da peroxidação lipídica – IC ₅₀ (mg/L)
Uva	2778±218	61±0,05	2609±257	729±81	4838±654	59±2	4972±164	258165±1756 8	124,1
Amora	981±185	38,1±0,06	409±154	233±37	1377±117	210±8	1856±164	164279±5856	30,6

Nota: CFT=compostos fenólicos totais, AGE=ácido gálico equivalente, CTE=catequina equivalente; FRAP=poder antioxidante de redução do ferro, AAE=ácido ascórbico equivalente, EDTAE=ácido etilenodiamina tetra-acético equivalente; DPPH=2,2-difenil-1-picrilhidrazil; QE=quercetina equivalente; ACE=ácido clorogênico equivalente.

Fonte: O autor.

2.3.3 Composição Fenólica por LC-MS

Os compostos que foram identificados nos extratos otimizados de uva e amora foram representados na Tabela 9. Compostos como: ácido 3,4-Dihidroxibenzoico ($5,7 \pm 0,1$ mg/100 g), catequina ($573,8 \pm 11,2$ mg/100 g), ácido *p*-cumárico ($1,2 \pm 0,0$ mg/100 g) e quercetina ($231,7 \pm 1,2$ mg/100 g), identificados nas análises de LC-MS (uva), também estão presentes nas análises realizadas por Gómez-Mejía et al. (2022), 147 ± 5 , 295 ± 37 , $7,8 \pm 0,9$ e 112 ± 5 µg/g, respectivamente. Já para os extratos de semente de amora foram identificados compostos, como: ácido 3,4-Dihidroxibenzoico, catequina, ácido ferrúlico, epicatequina e ácido cafeico, todos também observados nos estudos realizados por Halin et al. (2022), utilizando extrato (80% etanol) com várias partes da amora.

Tabela 9 – Composição fenólica dos extratos liofilizados de uva e amora.

(continua)

	Uva (mg/100 g)	Amora (mg/100 g)
<i>Ácido fenólico</i>		
Ácido ferúlico	$1,3 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$
Ácido 2,5-Dihidroxibenzoico	ND	$33,5 \pm 1,6$
Ácido 3,4-Dihidroxibenzoico	$5,7 \pm 0,1$	$34,5 \pm 0,9$
Ácido salicílico	ND	$0,2 \pm 0,0$
Ácido <i>p</i> -cumárico	$1,2 \pm 0,0$	ND
Ácido cafeico	ND	$0,1 \pm 0,0$
Ácido sináptico	$0,6 \pm 0,0$	$0,9 \pm 0,1$
Sinapaldeido	ND	$1,0 \pm 0,0$
<i>Flavonoides</i>		
(-)-Epicatequina	$833,1 \pm 2,7$	$81,5 \pm 3,4$
(+)-Catequina	$573,8 \pm 11,2$	$88,8 \pm 3,4$
Epigallocatequina-3-galato	$785,0 \pm 1,6$	$8,4 \pm 0,1$
Quercetina	$231,7 \pm 1,2$	$15,2 \pm 0,2$
Quercetina-3-rutinosídeo	$72,6 \pm 1,0$	$13,1 \pm 0,6$
Quercetina-3-glucosídeo	$2,5 \pm 0,1$	$35,3 \pm 1,6$
Hesperidina	$9,1 \pm 0,7$	$12,7 \pm 0,3$
Kaempferol	ND	$1,8 \pm 0,1$
Kaempferol-3-rutinosídeo	$1,5 \pm 0,1$	ND
Taxifolina	$0,4 \pm 0,1$	ND
Pinocembrina	ND	$1,0 \pm 0,1$
Galangina	ND	$0,1 \pm 0,0$
Apigenina	ND	$0,2 \pm 0,0$

Tabela 9 – Composição fenólica dos extratos liofilizados de uva e amora.

(conclusão)

Outros		
Coniferaldeído	ND	0,5 ± 0,1
Total identificado (mg/100 g)	2519	329

Nota: ND=não detectado.

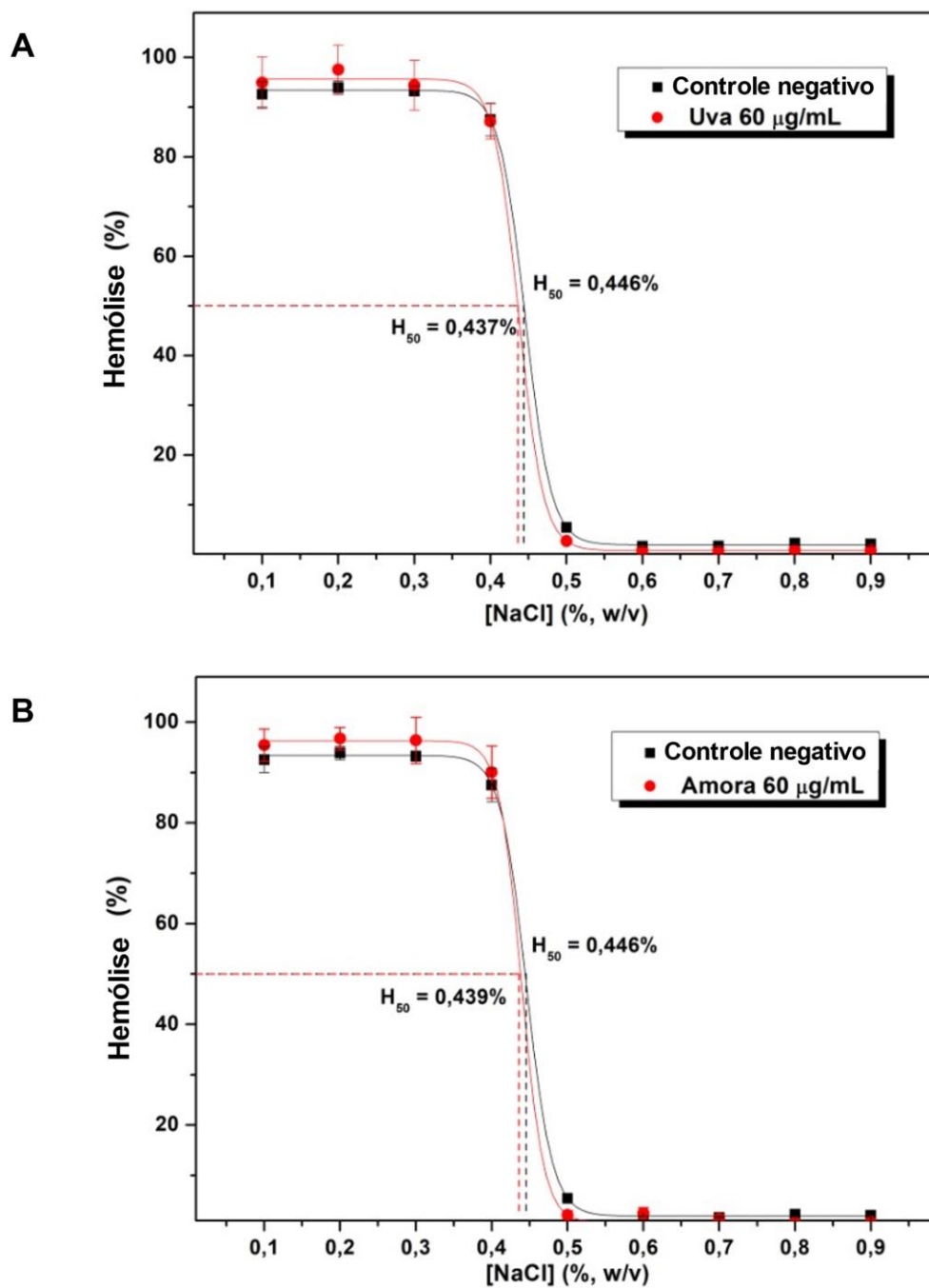
Fonte: O autor.

2.3.4 Atividade Anti-Hemolítica

A atividade anti-hemolítica *in vitro* dos extratos (60 µg/mL) foi avaliada em diferentes condições de osmolaridade ([NaCl] = 0,1 a 0,9%) e os resultados são mostrados na Figura 1. É possível verificar que os extratos apresentaram menor percentual de hemólise ou não diferente do controle (ausência de extrato) em todas as concentrações de NaCl, demonstrando efeito protetor sobre os eritrócitos, quando submetidos a condições hipotônicas e isotônicas, além de não apresentarem comportamento hemolítico em relação à concentração testada. A diminuição da concentração de NaCl em solução provoca a absorção de água pelo eritrócito, causando inchaço das células e, conseqüentemente, o extravasamento do conteúdo intracelular. A presença de compostos fenólicos auxilia na redução do parâmetro de fluidez da membrana eritrocitária, por meio de ligações de hidrogênio entre os fosfolipídios da membrana (cabeças polares) e os compostos fenólicos (ZHANG et al., 2019; CRUZ et al., 2021).

A concentração de NaCl, necessária para a hemólise de 50% dos eritrócitos (H_{50}), é uma forma de avaliar a capacidade que o extrato apresenta em proteger a membrana da hemólise. No presente estudo, o extrato otimizado de uva (60 µg/mL) obteve H_{50} de 0,437%, enquanto o controle (ausência de extrato) obteve H_{50} de 0,446%, já o extrato otimizado de amora (60 µg/mL) obteve H_{50} de 0,439%, enquanto o controle (ausência de extrato) obteve H_{50} de 0,446%. Atrooz, Harb e Al-Qato (2007), estudando extratos etanólicos de uma variedade de sementes, ilustram, em seus resultados, efeito anti-hemolítico, afirmando que o extrato de semente de uva apresentou os melhores resultados. Os resultados aqui apresentados reforçam a ausência de toxicidade *in vitro* dos extratos dessas sementes em eritrócitos, apesar de não apresentarem efeito protetor significativo.

Figura 12 – Efeito dos extratos liofilizados de uva (A) e amora (B) na hemólise de eritrócitos humanos em meio hipotônico.

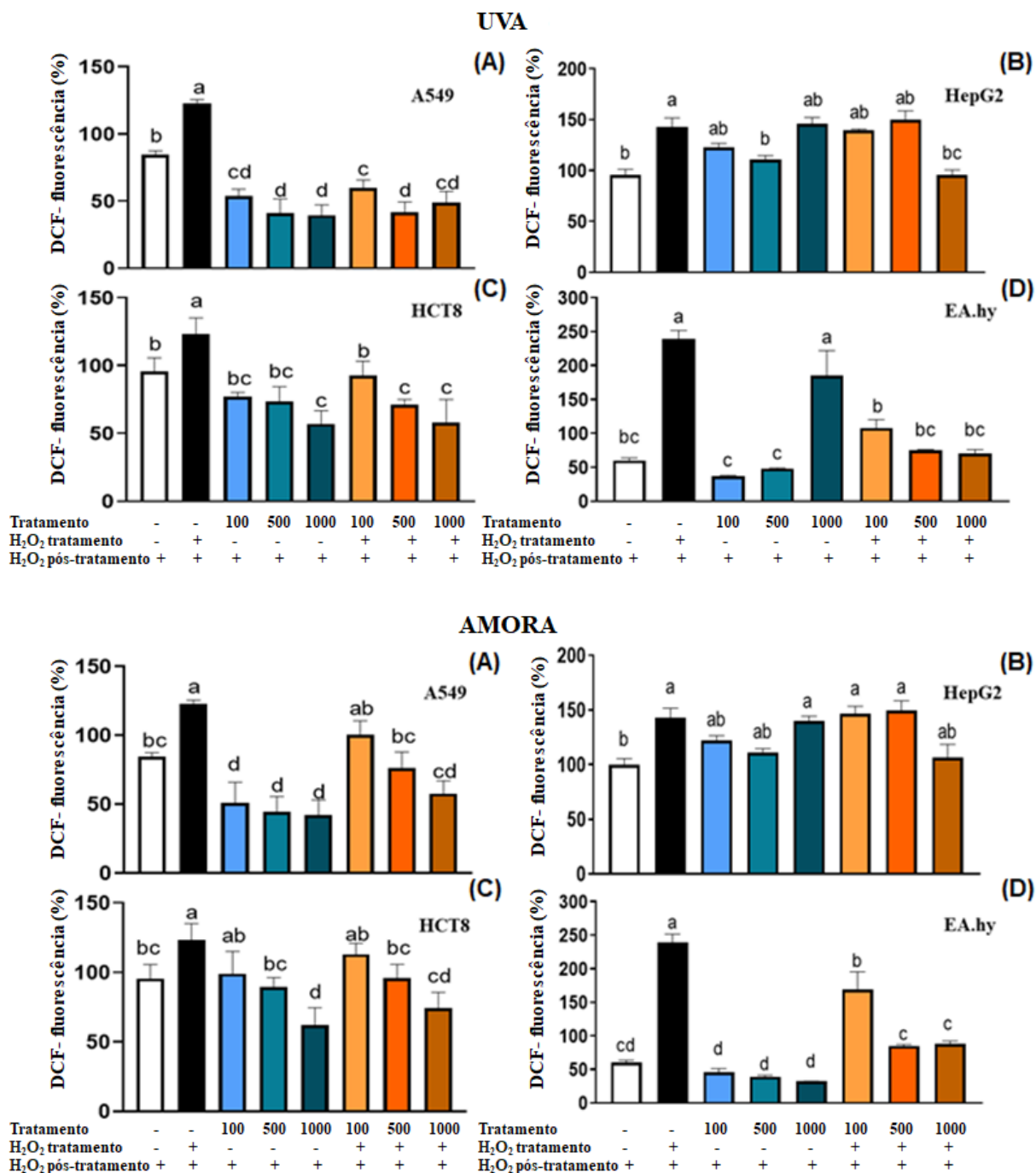


Fonte: O autor.

2.3.5 Geração de ERO's Intracelular e Viabilidade Celular

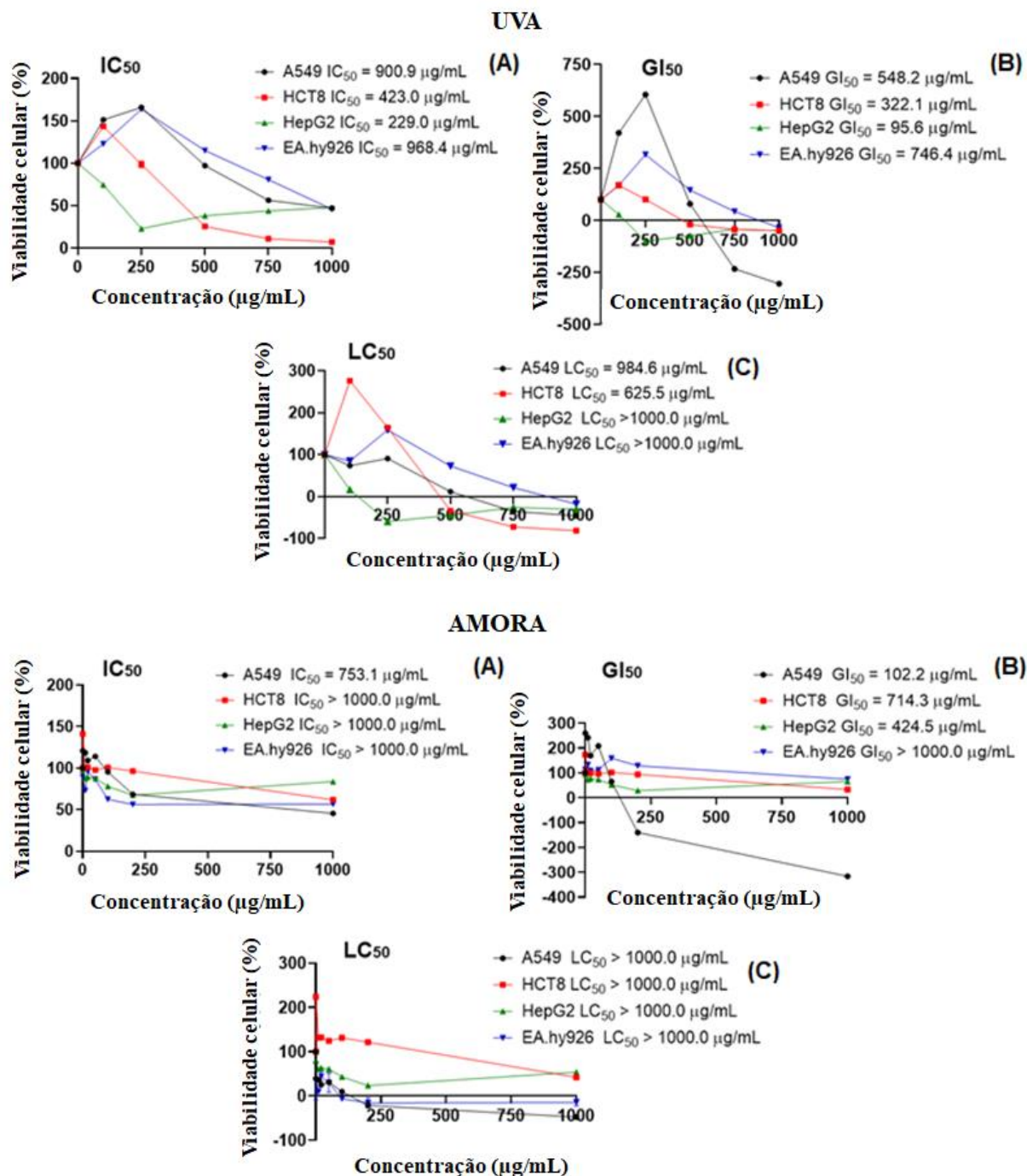
Compostos bioativos em sementes, como compostos fenólicos, flavonoides e taninos, podem, individual ou sinergicamente, fornecer proteção contra vários distúrbios, devido às propriedades antioxidantes. Eliminação de radicais livres, proteção contra danos ao DNA, indução de apoptose, inibição do crescimento e proliferação de células cancerígenas são apenas para citar alguns (BABY et al., 2018). Os extratos de uva e amora não induziram a geração de ERO's em células cancerígenas A549 e HCT8, além disso, exibiram um efeito protetor contra a produção de ERO's induzida por H_2O_2 (Figura 2). De fato, essa atividade antioxidante pode afetar a sinalização das células cancerígenas pró-tumorais, interferindo na sua viabilidade, observada neste estudo (A549 Uva: $IC_{50} = 900,9 \mu g/mL$; Amora: $IC_{50} = 753,1 \mu g/mL$; HCT8 Uva: $IC_{50} = 423,0 \mu g/mL$) e proliferação (A549 Uva: $IG_{50} = 548,2 \mu g/mL$; Amora: $IG_{50} = 100,2 \mu g/mL$; HCT8 Uva: $IG_{50} = 322,1 \mu g/mL$; Amora: $IG_{50} = 714,3 \mu g/mL$). De forma diferente, tanto a uva quanto a amora induziram estresse oxidativo em células cancerígenas HepG2, o que pode explicar a citotoxicidade observada no ensaio de viabilidade celular (Grape: $IC_{50} = 229,0 \mu g/mL$; $GI_{50} = 95,6 \mu g/mL$; Blackberry: $GI_{50} = 424,5 \mu g/mL$) (Figura 3). O aumento de ERO's em níveis tóxicos pode ativar a via JNK levando à morte celular (DO CARMO et al., 2018; MOLONEY; COTTER, 2018). No entanto, em HepG2, os extratos reduziram o estresse oxidativo induzido por H_2O_2 , exercendo atividade antioxidante. Para as células híbridas EA.hy, ambos os extratos protegeram contra os efeitos do peróxido, reduzindo os níveis de ERO's, abaixo da linha de base e, em geral, também foi observado um comportamento de baixa ou nenhuma toxicidade no teste de viabilidade celular. A capacidade antioxidante da uva e da amora pode ser correlacionada com todos os ensaios antioxidantes *in vitro* (FRAP, DPPH, TPC), em particular, a alta capacidade de capturar radicais OH (uva = 258165 ± 17568 mg AAE/100 g; amora = 164279 ± 5856 mg AAE/100g).

Figura 13 – Resultados da medição intracelular de ERO's em células A549 (A), HepG2 (B), HCT8 (C) e E.A.hy (D) por espectrofluorimetria. Tratamento otimizado e extrato liofilizado de sementes de uva (*Vitis labrusca* cv. Bordeaux) e sementes de amora (*Rubus fruticosus*) a 10-100 $\mu\text{g/mL}$. Os dados quantitativos são média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).



Fonte: O autor.

Figura 14 - Viabilidade celular e avaliação do efeito da concentração-dependente, após 48 horas de exposição ao extrato hidroalcoólico liofilizado em linhagens celulares A549, HCT8, HepG2 e Ea.hy. (A) IC₅₀: concentração do agente que inibe o crescimento celular em 50%; (B) GI₅₀: concentração do agente que inibe o crescimento em 50%, em relação às células não tratadas; (C) LC₅₀: concentração do agente que resulta em uma perda líquida de 50% de células, em relação ao número no início do tratamento.



Fonte: O autor.

2.4 CONCLUSÃO

Uma otimização simultânea foi aplicada, e uma combinação de 35,9 minutos de extração e relação massa-solvente de 1 g de semente desengordurada de uva para 61,28 mL de solvente extrator (etanol 60%) e 62,1 minutos de extração e relação massa-solvente de 1 g de semente desengordurada de amora para 64,1 mL de etanol 60% foram as combinações que apresentaram os melhores resultados. Os extratos de semente de uva e amora não induziram a geração de ERO's em células cancerígenas A549 e HCT8, mas, sim, exibiram um efeito protetor contra a produção de ERO's, induzida por H_2O_2 , ou seja, demonstraram atividade antioxidante e efeito protetor sobre os eritrócitos, quando submetidos a condições hipotônicas, bem como isotônicas, além de não apresentarem comportamento hemolítico em relação à concentração testada. Diante disso, ao observar os requisitos da Agenda 2030 e a necessidade de formas sustentáveis de produzir ingredientes alimentares, nossos resultados fornecem uma ampla avaliação da bioatividade de extratos obtidos por um processo simples e de baixo custo, utilizando solventes atóxicos, com potencial para serem utilizados em aplicações tecnológicas.

CONCLUSÕES GERAIS

A investigação apresentada destinou-se a comparar os diferentes métodos de extração sólido-líquido na composição química e propriedades funcionais de óleos de semente de uva bordô (*Vitis labrusca* Bordeaux) e amora-preta (*Rubus fruticosus* L.), assim como, estudar as sementes desengorduradas, após extração, de ambas as frutas. Com isso, foi possível concluir que os extratos apolares de sementes, obtidos pelos métodos estudados, apresentaram diferentes níveis de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, tanto para amora quanto para uva, e que seus materiais desengordurados apresentam propriedades benéficas à saúde. Sendo assim, um material considerado rejeito e que, muitas vezes, é descartado pela indústria alimentícia, a partir dos resultados já citados anteriormente, podem ser utilizados ou reintegrados na produção de alimentos saudáveis.

PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

Como foi possível identificar, o material em estudo apresenta características que contribuem para uma dieta saudável, assim, seria de grande importância o estudo da sua aplicabilidade em alimentos ou produtos cosméticos, bem como sua aceitação sensorial.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, J.; GONÇALVES, J. L.; ALVES, V. L.; CÂMARA, J. S. Chemical Fingerprint of Free Polyphenols and Antioxidant Activity in Dietary Fruits and Vegetables Using a Non-Targeted Approach Based on QuEChERS Ultrasound-Assisted Extraction Combined with UHPLC-PDA. **Antioxidants**, v. 9, n. 4, p. 305, 2020.
- AHMAD, A.; KALEEM, M.; AHMED, Z.; SHAFIQ, H. Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections-A review. **Food Research International**, v. 77, p. 221-235, 2015.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ANTONACCI D, B. M. Anticancer Effects of Grape Seed Extract on Human Cancers: A Review. **Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis**, v. s8, n. 01, 2014.
- APAK, R.; GORINSTEIN, S.; BÖHM, V.; SCHAICH, K. M.; ÖZYÜREK, M.; GÜÇLÜ, K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 85, n. 5, p. 957-998, 2013.
- APAK, R.; ÖZYUREK, M.; GUÇLU, K.; ÇAPANOGLU, E. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 2. Hydrogen Atom Transfer (HAT)-Based, Mixed-Mode (Electron Transfer (ET)/HAT), and Lipid Peroxidation Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 5, p. 1028-1045, 2016.
- ARAFAT, E. A.; SHABAAN, D. A. The possible neuroprotective role of grape seed extract on the histopathological changes of the cerebellar cortex of rats prenatally exposed to Valproic Acid: Animal model of autism. **Acta histochemica**, 121(7), 841–851, 2019.
- ARUOMA, O. I. Nutrition and Health Aspects of Free Radicals and Antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, p. 671-683, 1994.
- ASADI, S.; AHMADIANI, A.; ESMAEILI, M. A.; SONBOLI, A.; ANSARI, N.; KHODAGHOLI, F. In vitro antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six *Salvia* species from Iran: A comparative study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 5, p. 1341–1349, 2010.
- ATOLANI, O.; ADAMU, N.; OGUNTOYE, O.S.; ZUBAIR, M.F.; FABIYI, O.A.; OYEGOKE, R.A.; ADEYEMI, O.S.; AREH, E.T.; TARIGHA, D.E.; KAMBIZI, L.; OLATUNJI, G.A. Chemical characterization, antioxidant, cytotoxicity, Anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial potentials of the Citrus sinensis seed oil for sustainable cosmeceutical production. **Heliyon**, v. 6, n. 2, p. e03399, 2020.
- ATROOZ, O.; HARB, M.; AL-QATO, M. The Antioxidant and Antihaemolytic Activities and the Polyphenolic Contents of Some Plants Seeds Extracts. Mu'tah Lil-Buhuth Wad-Dirasat: **Natural and Applied Sciences Series**, v. 22, n. 2, p. 11-23, 2007.

AYOUB, M.; DE CAMARGO, A.C.; SHAHIDI, F. Antioxidants and bioactivities of free, esterified and insoluble-bound phenolics from berry seed meals. **Food Chem.** v. 197, p. 221–232, 2016.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.

BABY, B.; ANTONY, P.; VIJAYAN, R. Antioxidant and anticancer properties of berries. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 15, p. 2491–2507, 2018.

BADR EL-DIN, N. K.; ALI, D. A.; ABOU-EL-MAGD, R. F. Grape seeds and skin induce tumor growth inhibition via G1-phase arrest and apoptosis in mice inoculated with Ehrlich ascites carcinoma. **Nutrition**, v. 58, p. 100–109, 2019.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.

BASTÍAS-MONTES, J. M.; MONTERROSA, K.; MUÑOZ-FARIÑA, O.; GARCÍA, O.; ACUÑA-NELSON, S. M.; VIDAL-SAN MARTÍN, C.; QUEVEDO-LEON, R.; KUBO, I.; AVILA-ACEVEDO, J. G.; DOMINGUEZ-LOPEZ, M.; WEI, Z. THAKUR, K.; CESPEDES-ACUÑA, C. L. Chemoprotective and antiobesity effects of tocots from seed oil of Maqui-berry: Their antioxidative and digestive enzyme inhibition potential. **Food and Chemical Toxicology**, v. 136, p. 111036, 2019.

BELDA-GALBIS, C. M.; JIMÉNEZ-CARRETÓN, A.; PINA-PÉREZ, M. C.; MARTÍNEZ, A.; RODRIGO, D. Antimicrobial activity of açai against *Listeria innocua*. **Food Control**, v. 53, p. 212–216, 2015.

BERKER, K. I.; OZDEMIR OLGUN, F. A.; OZYURT, D.; DEMIRATA, B.; APAK, R. Modified Folin–Ciocalteu Antioxidant Capacity Assay for Measuring Lipophilic Antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 20, p. 4783–4791, 2013.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, n.8, p.911-917, 1959.

BORDIGA, M. Valorization of wine making by-products, CRC Press, Boca Raton (FL), USA, 1st Edition, p. 383, 2016.

BORGES, L. L.; MARTINS, F. S.; CONCEIÇÃO, E. C.; SILVEIRA, D. Optimization of the Spray-Drying Process for Developing Jabuticaba Waste Powder Employing Response Surface Methodology. **Journal of Food Process Engineering**, v. 40, n. 1, p. e12276, 2015.

BOYCE, M. C. Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweeteners permitted as additives in food by mixed micellar eletrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 847, p. 369-375, 1999.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutr. Rev.**, v. 56, p. 317-33, 1998.

BRENES, A.; VIVEROS, A.; CHAMORRO, S.; ARIJA, I. Use of polyphenol-rich grape byproducts in monogastric nutrition. A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 211, p. 1-7, 2016.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1-2, p. 21–33, 2005.

BUSZEWSKA-FORAJTA, M.; POMASTOWSKI, P.; MONEDEIRO, F.; KRÓLGÓRNIAK, A.; ADAMCZYK, P.; MARKUSZEWSKI, M. J.; BUSZEWSKI, B. New approach in determination of urinary diagnostic markers for prostate cancer by MALDI-TOF/MS. **Talanta**, v. 236, p. 122843, 2022.

CANABADY-ROCHELLE, L. L.; HARSCOAT-SCHIAVO, C.; KESSLER, V.; AYMES, A.; FOURNIER, F.; GIRARDET, J. M. Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: Revisited methods. **Food Chemistry**, v. 183, p. 129-135, 2015.

CARMO, M. A. V.; PRESSETE, C. G.; MARQUES, M. J.; GRANATO, D.; AZEVEDO, L. Polyphenols as potential antiproliferative agents: scientific trends. **Current Opinion in Food Science**, 2018.

CARTER, P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). **Analytical Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 450–458, 1971.

CASSIDY, A.; MUKAMAL, K. J.; LIU, L.; FRANZ, M.; ELIASSEN, A. H.; RIMM, E. B. High anthocyanin intake is associated with a reduced risk of myocardial infarction in young and middle-aged women. **Circulation**, v. 127, n. 2, p. 188-196, 2013.

CECCHI, L.; INNOCENTI, M.; URCIUOLI, S.; ARLORIO, M.; PAOLI, P.; MULINACCI, N. In depth study of phenolic profile and PTP-1B inhibitory power of cold-pressed grape seed oils of different varieties. **Food Chemistry**, v. 271, p. 380–387, 2019.

CENTIN-KARACA, H.; NEWMAN, M. C. Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against Salmonella and Escherichia Coli. **Food Bioscience**, v. 11, p. 8–16, 2015.

CHAO, C. Associations between Beer, Wine, and Liquor Consumption and Lung Cancer Risk: A Meta-analysis. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 16, n. 11, p. 2436–2447, 2007.

CHEN, F.; WANG, H.; ZHAO, J.; YAN, J.; MENG, H.; ZHAN, H.; CHEN, L.; YUAN, L. Grape seed proanthocyanidin inhibits monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension via attenuating inflammation: In vivo and in vitro studies. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 67, p. 72–77, 2019.

CHEN, W.; XU, Y.; ZHANG, L.; SU, H.; ZHENG, X. Blackberry subjected to in vitro gastrointestinal digestion affords protection against Ethyl Carbamate-induced cytotoxicity. **Food Chemistry**, v. 212, p. 620–627, 2016.

CHEUNG, L. M.; CHEUNG, P. C. K.; OOI, V. E. C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chemistry**, v. 81, p. 249-255, 2003.

CHIDAMBARA-MURTHY, K. N.; JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 17, p. 4791-4795, 2002.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vivo and in experimental animal infections. In: Lorian, V. (Ed.). **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 3. ed. Baltimore: William and Wilkins. Chapter 21, 1991.

COSTA, K. Á.; GUIMARÃES, A. C. R.; REIS, M. DE M.; SANTANA, C. S. A. Estudo do processo de lixiviação controlada da escória de aciaria em extrator soxhlet visando emprego em pavimentos. **Matéria**, v. 22, n. 2, 2017.

CREWS, C.; HOUGH, P.; GODWARD, J.; BRERETON, P.; LEES, M.; GUIET, S.; WINKELMANN, W. Quantitation of the Main Constituents of Some Authentic Grape-Seed Oils of Different Origin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 17, p. 6261–6265, 2006.

CRUZ, T. M.; SANTOS, J. S.; DO CARMO, M. A. V.; HELLSTRÖM, J.; PIHLAVA, J. M.; AZEVEDO, L.; GRANATO, D.; MARQUES, M. B. Extraction optimization of bioactive compounds from ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) leaves and their in vitro antioxidant and antihemolytic activities. **Food Chemistry**, v. 361, 2021.

D ARCHIVIO, M.; FILES, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali-Istituto Superiore di Sanita**, v. 43, n. 4, p. 348, 2007.

DA FONSECA MACHADO, A. P.; REZENDE, C. A.; RODRIGUES, R. A.; BARBERO, G. F.; DE TARSO VIEIRA E ROSA, P.; MARTÍNEZ, J. Encapsulation of anthocyanin-rich extract from blackberry residues by spray-drying, freeze-drying and supercritical antisolvent. **Powder Technology**, v. 340, p. 553–562, 2018.

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

DAI, J.; GUPTE, A.; GATES, L.; MUMPER, R. J. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 4, p. 837–847, 2009.

DAKER, M.; ABDULLAH, N.; VIKINESWARY, S.; GOH, P.; KUPPUSAMY, U. Antioxidant from maize and maize fermented by *Marasmiellus* sp. as stabiliser of lipid-rich foods. **Food Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 1092-1098, 2007.

DÁVALOS, A.; GOMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Commercial dietary antioxidant supplements assayed for their antioxidant activity by different methodologies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2512-2519, 2003.

DE AZEVEDO, J. C. S.; FUJITA, A.; DE OLIVEIRA, E. L.; GENOVESE, M. I.; CORREIA, R. T. P. Dried camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. McVaugh) industrial residue: A bioactive-rich Amazonian powder with functional attributes. **Food Research International**, v. 62, p. 934–940, 2014.

DE LUCA, V.; ST PIERRE, B. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 4, p. 168–173, 2000.

DE SANTANA, F. C.; SHINAGAWA, F. B.; ARAUJO, E. DA S.; COSTA, A. M.; MANCINI-FILHO, J. Chemical Composition and Antioxidant Capacity of Brazilian *Passiflora* Seed Oils. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 12, p. C2647–C2654, 2015.

DE STEFANI, E.; CORREA, P.; DENEOPELLEGRINI, H.; BOFFETTA, P.; GUTIÉRREZ, L. P.; RONCO, A.; BRENNAN, P.; MENDILAHARSU, M. Alcohol intake and risk of adenocarcinoma of the lung. **Lung Cancer**, v. 38, n. 1, p. 9–14, 2002.

DELVALLE, J.M.; AGUILERA, J.M. Review: high pressure CO₂ extraction, Fundamentals and Application sin the Food Industry v. 5, p. 1–24, 1999.

DENG, Y.; WANG, W.; ZHAO, S.; YANG, X.; XU, W.; GUO, M.; XU, E.; DING, T.; YE, X.; LIU, D. Ultrasound-assisted extraction of lipids as food components: Mechanism, solvent, feedstock, quality evaluation and coupled technologies – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 122, p. 83-96, 2022.

DEOLINDO, C. T. P.; MONTEIRO, P. I.; SANTOS, J. S.; CRUZ, A. G.; DA SILVA, M. C.; GRANATO, D. Phenolic-rich Petit Suisse cheese manufactured with organic Bordeaux grape juice, skin, and seed extract: Technological, sensory, and functional properties. **LWT**, 108493, 2019.

DI MEO, F.; AVERSANO, R.; DIRETTO, G.; DEMURTAS, O. C.; VILLANO, C.; COZZOLINO, S.; FILOSA, S.; CARPUTO, D.; CRISPI, S. Anti-cancer activity of grape seed semi-polar extracts in human mesothelioma cell lines. **Journal of Functional Foods**, v. 61, p. 103515, 2019.

DI STEFANO, V.; BONGIORNO, D.; BUZZANCA, C.; INDELICATO, S.; SANTINI, A.; LUCARINI, M.; FABBRIZIO, A.; MAURO, M.; VAZZANA, M.; ARIZZA, V.; DURAZZO, A. Fatty Acids and Triacylglycerols Profiles from Sicilian (Cold Pressed vs. Soxhlet) Grape Seed Oils. **Sustainability**, v. 13, p. 13038, 2021.

DINICOLA, S.; CUCINA, A.; ANTONACCI, D.; BIZZARRI M. Anticancer Effects of Grape Seed Extract on Human Cancers: A Review. **Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis**, v. s8, n. 01, 2014.

DO CARMO, M. A. V.; FIDELIS, M.; PRESSETE, C. G.; MARQUES, M. J.; CASTRO-GAMERO, A. M.; MYODA, T.; GRANATO, D.; AZEVEDO, L. Hydroalcoholic Myrciaria dubia (camu-camu) seed extracts prevent chromosome damage and act as antioxidant and cytotoxic agents. **Food Research International**, v. 125, p. 108551, 2019.

DO CARMO, M. A. V.; PRESSETE, C. G.; MARQUES, M. J.; GRANATO, D.; AZEVEDO, L. Polyphenols as potential antiproliferative agents: scientific trends. **Current Opinion in Food Science**, v. 24, p. 26–35, 2018.

DONELLI, J. K.; ROBINSON, D. S. Free radical in foods. **Free Radical Resource**, v. 22, n. 2, p. 147-176, 1995.

DUMITRIU, D.; PEINADO, R. A.; PEINADO, J.; DE LERMA, N. L. Grape pomace extract improves the in vitro and in vivo antioxidant properties of wines from sun light dried Pedro Ximénez grapes. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 380–387, 2015.

DURAN, M.; ADAY, M. S.; ZORBA, N. N. D.; TEMIZKAN, R.; BÜYÜKCAN, M. B.; CANER, C. Potential of antimicrobial active packaging “containing natamycin, nisin, pomegranate and grape seed extract in chitosan coating” to extend shelf life of fresh strawberry. **Food and Bioprocesses Processing**, v. 98, p. 354–363, 2016.

Embrapa. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <https://www.embrapa.br/>. Acesso em 15/06/2020.

Embrapa. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <https://www.embrapa.br/>. Acesso em 20/04/2020.

FAZIO, A.; PLASTINA, P.; MEIJERINK, J.; WITKAMP, R.F.; GABRIELE, B. Comparative analyses of seeds of wild fruits of Rubus and Sambucus species from Southern Italy: Fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts. **Food Chemistry**, v. 140, p. 817–824, 2013.

FERNANDES, L.; PEREIRA, J.A.; CORTÉS, I.L.; SALAZAR, D.M.; RAMALHOSA, E.; CASAL, S. Fatty acid, vitamin E and sterols composition of seed oils from nine different pomegranate (Punica granatum L.) cultivars grown in Spain. **J. Food Compos. Anal.**, v. 39, p. 13–22, 2015.

FERNÁNDEZ-OCHOA, Á.; BORRÁS-LINARES, I.; PÉREZ-SÁNCHEZ, A.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, I.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; MICOL, V.; SEGURA-CARRETERO, A. Phenolic compounds in rosemary as potential source of bioactive compounds against colorectal cancer: In situ absorption and metabolism study. **J. Funct. Foods**, v. 33, p. 202-210, 2017.

FIDELIS, M.; MOURA, C.; KABBAS JUNIOR, T.; PAP, N.; MATTILA, P.; MÄKINEN, S.; PUTNIK, P.; KOVACEVIC, D. B.; TIAN, Y.; YANG, B.; GRANATO, D. Fruit Seeds

as Sources of Bioactive Compounds: Sustainable Production of High Value-Added Ingredients from By-Products within Circular Economy. **Molecules**, v. 24, n. 21, p. 3854, 2019.

FIDELIS, M.; SANTOS, J. S.; ESCHER, G. B.; VIEIRA DO CARMO, M.; AZEVEDO, L.; CRISTINA DA SILVA, M.; PUTNIK, P.; GRANATO, D. In vitro antioxidant and antihypertensive compounds from camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh, Myrtaceae) seed coat: A multivariate structure-activity study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 120, p. 479–490, 2018.

FILIPPI, K.; GEORGAKA, N.; ALEXANDRI, M.; PAPAPOSTOLOU, H.; KOUTINAS, A. Valorisation of grape stalks and pomace for the production of bio-based succinic acid by *Actinobacillus succinogenes*. **Industrial Crops and Products**, v. 168, p. 113578, 2021.

FIUME, M. M.; BERGFELD, W. F.; BELSITO, D. V.; HILL, R. A.; KLAASSEN, C. D.; LIEBLER, D. C.; MARKS JR, J. G.; SHANK, R. C.; SLAGA, T. J.; SNYDER, P. W. Safety assessment of *Vitis vinifera* (Grape)-derived ingredients as used in cosmetics. **International Journal of Toxicology**, v. 33, p. 48-83, 2014.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v.226, n.1, p.497-509, 1957.

FONTANA, A. R.; ANTONILLI, A.; BOTTINI, R. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 8989-9003, 2013.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 6, p. 1583-1606, 2011.

GOĐEVAC, D.; TEŠEVIĆ, V.; VAJS, V.; MILOSAVLJEVIĆ, S.; STANKOVIĆ, M. Blackberry Seed Extracts and Isolated Polyphenolic Compounds Showing Protective Effect on Human Lymphocytes DNA. **J. Food Sci.**, v. 76, p. C1039–C1043, 2011.

GÓMEZ-MEJÍA, E.; MIKKELSEN, L. H.; ROSALES-CONRADO, N.; LEÓN-GONZÁLEZ, M. E.; MADRID, Y. A combined approach based on matrix solid-phase dispersion extraction assisted by titanium dioxide nanoparticles and liquid chromatography to determine polyphenols from grape residues. **Journal of Chromatography A**, v. 1644, p. 462128, 2021.

GÓMEZ-MEJÍA, E.; VICENTE-ZURDO, D.; ROSALES-CONRADO, N.; LEÓN-GONZÁLEZ, MARÍ.EUGENIA.; MADRID, Y. Screening the extraction process of phenolic compounds from pressed grape seed residue: Towards an integrated and sustainable management of viticultural waste. **LWT – Food Science and Technology**, v. 169, p. 113988, 2022.

GONÇALVES, G. A.; SOARES, A. A.; CORREA, R. C. G.; BARROS, L.; HAMINIUK, C. W. I.; PERALTA, R. M.; FERREIRA, I. C. F. R.; BRACHT, A. Merlot grape pomace hydroalcoholic extract improves the oxidative and inflammatory states of rats with adjuvant-induced arthritis. **Journal of Functional Foods**, v. 33, p. 408–418, 2017.

GOWD, V.; BAO, T.; CHEN, W. Antioxidant potential and phenolic profile of blackberry anthocyanin extract followed by human gut microbiota fermentation. **Food Research International**, v. 120. P. 523-533, 2018.

GOWD, V.; BAO, T.; WANG, L.; HUANG, Y.; CHEN, S.; ZHENG, X.; CUI, S.; CHEN, W. Antioxidant and antidiabetic activity of blackberry after gastrointestinal digestion and human gut microbiota fermentation. **Food Chemistry**, v. 269, p. 618–627, 2018.

GRANATO, D.; GREVINK, R.; ZIELINSKI, A. A. F.; NUNES, D. S.; VAN RUTH, S. M. Analytical strategy coupled with response surface methodology to maximize the extraction of antioxidants from ternary mixtures of green, yellow, and red teas (*camellia sinensis* var. *sinensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 42, p. 10283–10296, 2014.

GRANATO, D.; KOOT, A.; SCHNITZLER, E.; VAN RUTH, S. M. Authentication of geographical origin and farming system of grape juices by phenolic compounds and antioxidant activity using chemometrics. **Journal of Food Science**, v. 80, p. 84-593, 2015.

GRANATO, D.; RESHAMWALA, D.; KORPINEN, R.; AZEVEDO, L.; VIEIRA DO CARMO, M. A.; CRUZ, T. M.; MARQUES, M. B.; WEN, M.; ZHANG, L.; MARJOMÄKI, V.; KILPELÄINEN, P. From the forest to the plate – Hemicelluloses, galactoglucomannan, glucuronoxylan, and phenolic-rich extracts from unconventional sources as functional food ingredients. **Food Chemistry**, v. 381, p. 132284, 2022.

GRANATO, D.; SANTOS, J. S.; MACIEL, L. G.; NUNES, D. S. Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 266-279, 2016.

GRANATO, D.; SHAHIDI, F.; WROLSTAD, R.; KILMARTIN, P.; MELTON, L. D.; HIDALGO, F. J.; MIYASHITA, K.; VAN CAMP, J.; ALASALVAR, C.; ISMAIL, A. B.; ELMORE, S.; BIRCH, G. G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; ASTLEY, S. B.; PEGG, R.; ZHOU, P.; FINGLAS, P. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? **Food Chemistry**, v. 264, p. 471–475, 2018.

GREMSKI, L. A.; COELHO, A. L. K.; SANTOS, J. S.; DAGUER, H.; MOLOGNONI, L.; DO PRADO-SILVA, L.; SANT'ANA, A. S.; ROCHA DA SILVA, R.; DA SILVA, M. C.; CRUZ, A. G.; AZEVEDO, L.; DO CARMO, M. A. V.; WEN, M.; ZHANG, L.; GRANATO, D. Antioxidants-rich ice cream containing herbal extracts and futoooligosaccharides: manufacture, functional and sensory properties. **Food Chemistry**, v. 10, n. 15, p. 125098, 2019.

GUO, C.; YANG, J.; WEI, J.; LI, Y.; XU, J.; JIANG, Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. **Nutrition Research**, v. 23, n. 12, p. 1719–1726, 2003.

HAKIMUDDIN, F.; TIWARI, K.; PALIYATH, G.; MECKLING, K. Grape and wine polyphenols down-regulate the expression of signal transduction genes and inhibit the growth of estrogen receptor–negative MDA-MB231 tumors in nu/nu mouse xenografts. **Nutrition Research**, v. 28, n. 10, p. 702–713, 2008.

HALIN, M. A.; KANAN, K. A.; NAHAR, T.; RAHMAN, M. J.; AHMED, K. S.; HOSSAIN, H.; MOZUMDER, N. H. M. R.; AHMED, M. Metabolic profiling of phenolics of the extracts from the various parts of blackberry plant (*Syzygium cumini* L.) and their antioxidant activities. **Food Science and Technology. LWT**, v. 127, n. 49, p. 113813, 2022.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford: **Oxford University Press**, v. 4, p. 888, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and Medicine. **Oxford Press**, 3th ed., Londres, p. 899, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Free Radicals in Biology and Medicine. **Oxford University Press**, USA, 5th Edition, 2015.

HARBEOUI, H.; HICHAMI, A.; WANNES, W. A.; LEMPUT, J.; TOUNSI, M. S.; KHAN, N. A. Anti-inflammatory effect of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extract through the downregulation of NF- κ B and MAPK pathways in LPS-induced RAW264.7 macrophages. **South African Journal of Botany**, v. 125, p. 1–8, 2019.

HERMES-LIMA, M. Oxidative stress and medical sciences. In: Storey, K. B. Functional Metabolism. Regulation and adaptation. Hoboken, New Jersey, p. 370-382, 2004.

HORSZWALD, A.; ANDLAUER, W. Characterisation of bioactive compounds in berry juices by traditional photometric and modern microplate methods. **Journal of Berry Research**, v. 1, n. 4, p. 189–199, 2011.

HROMÁDKOVÁ, Z.; KOVÁČIKOVÁ, J.; EBRINGEROVÁ, A. Study of the classical and ultrasound-assisted extraction of the corn cob xylan. **Industrial Crops and Products**, v. 9, n. 2, p. 101–109, 1999.

HUSSEIN, J.; EL-NAGGAR, M. E.; FOUHA, M. M. G.; MORSY, O. M.; AJAREM, J. S.; ALMALKI, A. M.; ALLAM, A. A.; MEKAWI, E. M. The efficiency of blackberry loaded AgNPs, AuNPs and AgAuNPs mediated pectin in the treatment of cisplatin-induced cardiotoxicity in experimental rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 159, p. 1084–1093, 2018.

INDELICATO, S.; BONGIORNO, D.; PITONZO, R.; DI STEFANO, V.; CALABRESE, V.; INDELICATO, S.; AVELLONE, G. Triacylglycerols (TAGs) in edible oils: determination, characterization, quantitation, chemometric approach and evaluation of adulterations. **J. Cromatogr. A**, v. 1515, p. 1-16, 2017.

İŞÇİMEN, E. M.; HAYTA, M. Microwave-assisted aqueous two-phase system based extraction of phenolics from pulses: Antioxidant properties, characterization and encapsulation. **Industrial Crops and Products**, v. 173, p. 114144, 2021.

JARA-PALACIOS, M. J.; HERNANZ, D.; CIFUENTES-GOMEZ, T.; ESCUDERO-GILETE, M. L.; HEREDIA, F. J.; SPENCER, J. P. E. Assessment of white grape pomace from winemaking as source of bioactive compounds, and its antiproliferative activity. **Food Chemistry**, v. 183, p. 78–82, 2015.

JUNIOR, T. K.; DE MOURA, C.; DO CARMO, M. A. V.; AZEVEDO, L.; ESMERINO, L. A.; TARDIVO, R. C.; KILPELÄINEN, P.; GRANATO, D. Chemical Composition, Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic/Cytoprotective Activity of Non-Polar Extracts of Grape (*Vitis labrusca* cv. Bordeaux) and Blackberry (*Rubus fruticosus*) Seeds. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 4057, 2021.

KAO, M. P. C.; ANG, D. S. C.; PALL, A.; STRUTHERS, A. D. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options. **Journal of Human Hypertension**, v. 24, n. 1, p. 1-8, 2010.

KARNOPP, A. R.; OLIVEIRA, K. G.; DE ANDRADE, E. F.; POSTINGHER, B. M.; GRANATO, D. Optimization of an organic yogurt based on sensorial, nutritional, and functional perspectives. **Food Chemistry**, v. 233, p. 401–411, 2017.

KAUME, L.; HOWARD, L. R.; DEVAREDDY, L. The Blackberry Fruit: A Review on Its Composition and Chemistry, Metabolism and Bioavailability, and Health Benefits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 23, p. 5716-5727, 2012.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium's health. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 36, n. 7, p. 703–725, 2001.

KAY, C. D.; PEREIRA-CARO, G.; LUDWIG, I. A.; CLIFFORD, M. N.; CROZIER, A. Anthocyanins and flavanones are more bioavailable than previously perceived: a review of recent evidence. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 8, p. 155-180, 2017.

KEHRER, J. P.; TIPPLE, T. E.; ROBERTSON, J. D.; SMITH, C. V. Free radicals and reactive oxygen species. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164-175, 2014.

KOUKA, P.; CHATZIEFFRAIMIDI, G.-A.; RAFTIS, G.; STAGOS, D.; ANGELIS, A.; STATHOPOULOS, P.; XYNOS, N.; SKALTSOUNIS, A.-L.; TSATSAKIS, A.M.; KOURETAS, D. Antioxidant effects of an olive oil total polyphenolic fraction from a Greek Olea europaea variety in different cell cultures. **Phytomedicine**, v. 47, p. 135–142, 2018.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, p. 1-17, 2013.

LA PAZ, S.M.-D.; FERNÁNDEZ-ARCHE, M.; BERMÚDEZ, B.; GARCIA-GIMENEZ, M.D. The sterols isolated from evening primrose oil inhibit human colon adenocarcinoma cell proliferation and induce cell cycle arrest through upregulation of LXR. **J. Funct. Foods**, v. 12, p. 64–69, 2015.

LAJILI, S.; AZOUAOU, S. A.; TURKI, M.; MULLER, C. D.; BOURAOU, A. Anti-inflammatory, analgesic activities and gastro-protective effects of the phenolic contents of the red alga, *Laurencia obtusa*. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 8, n. 3, p. 298–306, 2016.

LAO, L.; SHEN, J.; TIAN, H.; YAO, Q.; LI, Y.; QIAN, L.; MURRAY, S. S.; WANG, J. C. Secreted Phosphoprotein 24 kD Inhibits Growth of Human Prostate Cancer Cells Stimulated by BMP-2. **Anticancer Research**, v. 36, n. 11, p. 5773–5780, 2016.

LEAL, C.; GOUVINHAS, I.; SANTOS, R. A.; ROSA, E.; SILVA, A. M.; SAAVEDRA, M. J.; BARROS, A. I. R. N. A. Potential application of grape (*Vitis vinifera* L.) stem extracts in the cosmetic and pharmaceutical industries: Valorization of a by-product. **Industrial Crops and Products**, v. 154, p. 112675, 2020.

LEE, S. Y. H.; MUNEROL, B.; POLLARD, S.; YODIM, K. A.; PANNALA, A. S.; KUHNLE, G. G. C.; DEBNAM, E. S.; RICE-EVANS, C.; SPENCER, J. P. E. The reaction of flavanols with nitrous acid protects against N-nitrosamine formation and leads to the formation of nitroso derivatives which inhibit cancer cell growth. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 2, p. 323–334, 2006.

LEE, S.-J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K.-G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131–137, 2005.

LIANG, Z.; CHENG, L.; ZHONG, G.-Y.; LIU, R. H. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Twenty-Four *Vitis vinifera* Grapes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e105146, 2014.

LÓPEZ, A.C.; DENICOL, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products. A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1–10, 2013.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2383–2389, 2010.

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

LUTTERODT, H.; SLAVIN, M.; WHENT, M.; TURNER, E.; YU, L. (LUCY). Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. **Food Chemistry**, v. 128, n. 2, p. 391–399, 2011.

MAESTRO DURÁN, R.; BORJA PADILLA, R.; MARTÍN MARTÍN, A.; FIESTAS DE URSINOS, J. A.; ALBA MENDOZA, J. Biodegradación de los compuestos fenólicos presentes en el alpechín. **Grasas y Aceites**, v. 42, n. 4, p. 271–276, 1991.

MARGRAF, T.; KARNOPP, A. R.; ROSSO, N. D.; GRANATO, D. Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue assays to estimate the total phenolic content of juices and teas using 96-well microplates. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 11, p. C2397–C2403, 2015.

MARGRAF, T.; KARNOPP, A. R.; ROSSO, N. D.; GRANATO, D. Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 11, p. C2397–C2403, 2015.

MARGRAF, T.; SANTOS, É. N. T.; DE ANDRADE, E. F.; VAN RUTH, S. M.; GRANATO, D. Effects of geographical origin, variety and farming system on the chemical markers and in vitro antioxidant capacity of Brazilian purple grape juices. **Food Research International**, v. 82, p. 145–155, 2016.

MARTÍNEZ LAPUENTE, L.; GUADALUPE, Z.; AYESTARÁN, B.; PÉREZ-PORRAS, P.; BAUTISTA-ORTÍN, A. B.; GÓMEZ-PLAZA, E. Ultrasound treatment of crushed grapes: Effect on the must and red wine polysaccharide composition. **Food Chemistry**, v. 356, p. 129669, 2021.

MARTINS, N.; BARROS, L.; FERREIRA, I.C.F.R. *In vivo* antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 48, p. 1–12, 2016.

MAURER, L. H.; CAZARIN, C. B. B.; QUATRIN, A.; MINUZZI, N. M.; COSTA, E. L.; MORARI, J.; VELLOSO, L. A.; LEAL, R. F.; RODRIGUES, E.; BOCHI, V. C.; JUNIOR, M. R.; EMANUELLI, T. Grape peel powder promotes intestinal barrier homeostasis in acute TNBS-colitis: A major role for dietary fiber and fiber-bound polyphenols. **Food Research International**, v. 123, p. 425-439, 2019.

MEINI, M.-R.; CABEZUDO, I.; BOSCHETTI, C.E.; ROMANINI, D. Recovery of phenolic antioxidants from Syrah grape pomace through the optimization of an enzymatic extraction process. **Food Chemistry**, v. 283, p. 257–264, 2019.

MICIĆ, D.M.; OSTOJIC, S.; SIMONOVIC, M.; KRSTIĆ, G.; PEZO, L.; SIMONOVIĆ, B.R. Kinetics of blackberry and raspberry seed oils oxidation by DSC. **Thermochim. Acta**, v. 601, p. 39–44, 2015.

MIGLIORINI, A. A.; PIROSKI, C. S.; DANIEL, T. G.; CRUZ, T. M.; ESCHER, G. B.; VIEIRA DO CARMO, M. A.; AZEVEDO, L.; MARQUES, M. B.; GRANATO, D.; ROSSO, N. D. Red Chicory (*Cichorium intybus*) Extract Rich in Anthocyanins: Chemical Stability, Antioxidant Activity, and Antiproliferative Activity In Vitro. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 5, p. 990-1001, 2019.

MOLONEY, J. N.; COTTER, T. G. ROS signalling in the biology of cancer. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 80, p. 50–64, 2018.

MONTEIRO, G. C.; MINATEL, I. O.; JUNIOR, A. P.; GOMEZ-GOMEZ, H. A.; DE CAMARGO, J. P. C.; DIAMANTE, M. S.; BASÍLIO, L. S. P.; TECCHIO, M. A.; LIMA,

G. P. P. Bioactive compounds and antioxidant capacity of grape pomace flours. **LWT**, v. 135, p. 110053, 2020.

MONTSERRAT-DE LA PAZ, S.; FERNÁNDEZ-ARCHE, M.A.; BERMÚDEZ, B.; GARCÍA-GIMÉNEZ, M.D. The sterols isolated from evening primrose oil inhibit human colon adenocarcinoma cell proliferation and induce cell cycle arrest through upregulation of LXR. **J. Funct. Foods** v. 12, p. 64–69, 2015.

MORABITO, R.; REMIGANTE, A.; DI PIETRO, M. L.; GIANNETTO, A.; LA SPADA, G.; MARINO, A. SO4 = uptake and catalase role in preconditioning after H2O2-induced oxidative stress in human erythrocytes. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 469, n. 2, p. 235–250, 2017.

MORAES, D. P.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; MACHADO, M. L.; VIZZOTTO, M.; LAZZARETTI, M.; LEYVA-JIMENES, F. J. J. Characterization of a new blackberry cultivar BRS Xingu: Chemical composition, phenolic compounds, and antioxidant capacity in vitro and in vivo. **Food Chemistry**, v. 322, p. 126783, 2020.

MU, J.; WU, G.; CHEN, Z.; BRENNAN, C. S.; TRAN, K.; DILRUKSHI, H. N. N.; SHI, C.; ZHEN, H.; HUI, X. Identification of the fatty acids profiles in supercritical CO2 fluid and Soxhlet extraction of Samara oil from different cultivars of *Elaeagnus mollis* Diels seeds. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 101, p. 103982, 2021.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95–111, 2004.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; DE MARTINO, L.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451–1474, 2013.

NELSON, J.G. Isolation and purification of lipids from biological matrices. In: PERKINS, E.G. (Ed.). Analyses of fats, oils and lipoproteins. **Champaign: American Oil Chemists' Society (AOCS)**, cap.2, p.20-59, 1991.

NOGUEIRA, G. F.; SOARES, C. T.; CAVASINI, R.; FAKHOURI, F. M.; DE OLIVEIRA, R. A. Bioactive films of arrowroot starch and blackberry pulp: Physical, mechanical and barrier properties and stability to pH and sterilization. **Food Chemistry**, v. 275, p. 417-425, 2018.

NUNES, M. A.; PIMENTEL, F. B.; COSTA, A. S. G.; ALVES, R. C.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Olive by-products for functional and food applications: Challenging opportunities to face environmental constraints. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 35, p. 139–148, 2016.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, p. 10-36, 2015.

OTHMÈNE, Y. BEN, SALEM, I.; BEN, HAMDY, H.; ANNABI, E.; ABID-ESSEFI, S. Tebuconazole induced cytotoxic and genotoxic effects in HCT116 cells through ROS generation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 174, p. 104797, 2021.

ÖZCAN, M. M.; GHAFOR, K.; AL JUHAIMI, F.; AHMED, I. A. M.; BABIKER, E. E. Effect of cold-press and soxhlet extraction on fatty acids, tocopherols and sterol contents of the Moringa seed oils. **South African Journal of Botany**, v. 124, p. 333–337, 2019.

PÉREZ-PORRAS, P.; BAUTISTA-ORTÍN, A. B.; JURADO, R.; GOMEZ-PLAZA, E. Using highpower ultrasound in red winemaking: Effect of operating conditions on wine physico-chemical and chromatic characteristics. **LWT-Food Science and Technology**, v. 138, p. 110645, 2021.

PAP, N.; FIDELIS, M.; AZEVEDO, L.; DO CARMO, M. A. V.; WANG, D.; MOCAN, A.; PEREIRA, E. P. R.; XAVIER-SANTOS, D.; SANT'ANA, A. S.; YANG, B.; GRANATO, D. (2021). Berry polyphenols and human health: evidence of antioxidant, anti-inflammatory, microbiota modulation, and cell-protecting effects. **Current Opinion in Food Science**, v. 42, p. 167–186, 2021.

PASINI DEOLINDO, C. T.; MONTEIRO, P. I.; SANTOS, J. S.; CRUZ, A. G.; CRISTINA DA SILVA, M.; GRANATO, D. Phenolic-rich Petit Suisse cheese manufactured with organic Bordeaux grape juice, skin, and seed extract: Technological, sensory, and functional properties. **LWT**, v. 115, n. 01, p. 108493, 2019.

PIASECKA, I.; GÓRSKA, A.; OSTROWSKA-LIGŁEZA, E.; KALISZ, S. The Study of Thermal Properties of Blackberry, Chokeberry and Raspberry Seeds and Oils. **Appl. Sci.**, v. 11, p. 7704, 2021.

PIETTA, P-G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PIMENTEL, C. V. M. L.; FRANCKI, K. M.; BOIAGO, A. P. Alimentos Funcionais – Introdução às principais substâncias bioativas em alimentos. 1ª ed., **Metha**, p. 95, 2005.

PINELO, M.; ARNOUS, A.; MEYER, A. S. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 11, p. 579–590, 2006.

PRASAD, C.; IMRHAN, V.; JUMA, S.; MAZIARZ, M.; PRASAD, A.; TIERNAN, C.; VIJAYAGOPAL, P. Bioactive plant metabolites in the management of non-communicable metabolic diseases: Looking at opportunities beyond the horizon. **Metabolites**, v. 5, n. 4, p. 733–765.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standard methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290–4302, 2005.

QI, Y.; CHEN, S.; LU, Y.; ZHANG, Z.; WANG, S.; CHEN, N.; SHEN, M.; CHEN, F.; CHEN, M.; QUAN, Y.; YANG, L.; XU, Y.; SU, Y.; HU, M.; WANG, J. Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates ionizing radiation-induced hematopoietic stem

progenitor cell injury by regulating Foxo1 in mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 174, p. 144–156, 2021.

QIANG, X., YONGLIE, C.; QIANBING, W. Health benefit application of functional oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 3, p. 435–441, 2009.

RAMIREZ-MARES, M. V.; KOBAYASHI, H.; DE MEJIA, E. G. Inhibitory effect of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts on the proliferation of human head and neck squamous carcinoma cells. **Toxicology Reports**, v. 3, p. 269–278, 2016.

RAO, A. V.; SNYDER, D. M. Raspberries and Human Health: A Review†. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 3871–3883, 2010.

ROMANINI, E. B.; RODRIGUES, L. M.; FINGER, A.; CHIERRITO, T. P. C.; SCAPIM, M. R. S.; MADRONA, G. S. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from BRS Violet grape pomace followed by alginate-Ca²⁺ encapsulation. **Food Chemistry**, v. 338, p. 128101, 2021.

RUANO-RAVINA, A. Type of wine and risk of lung cancer: a case-control study in Spain. **Thorax**, v. 59, n. 11, p. 981–985, 2004.

SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; OKADA, Y. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). **Food Chemistry**, v. 89, n. 4, p. 569–575, 2005.

SAMARAM, S.; MIRHOSSEINI, H.; TAN, C. P.; GHAZALI, H. M. Ultrasound-assisted extraction and solvent extraction of papaya seed oil: Crystallization and thermal behavior, saturation degree, color and oxidative stability. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 702–708, 2014.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: estructura y clasificación: presencia en alimentos y consumo: biodisponibilidad y metabolismo. **Alimentaria**, v. 329, p. 19–28, 2002.

SANTOS, A. C. V.; FERNANDES, C. C.; LOPES, L. M.; SOUSA, A. H. Use of plant oils from the southwestern Amazon for the control of maize weevil. **Journal of Stored Prod. Res.** V. 63, p. 67–70, 2015.

SANTOS, J. S.; ALVARENGA BRIZOLA, V. R.; GRANATO, D. High-throughput assay comparison and standardization for metal chelating capacity screening: A proposal and application. **Food Chemistry**, v. 214, p. 515–522, 2017.

SANTOS, J. S.; DEOLINDO, C. T. P.; HOFFMANN, J. F.; CHAVES, F. C.; DO PRADO-SILVA, L.; SANT'ANA, A. S.; AZEVEDO, L.; DO CARMO, M.A.V.; GRANATO, D. Optimized *Camellia Sinensis* var. *Sinensis*, *Ilex paraguariensis*, and *Aspalathus linearis* blend presents high antioxidant and antiproliferative activities in a beverage model. **Food Chemistry**, v. 254, p. 348–358, 2018.

SANTOS, J. S.; ESCHER, G. B.; DA SILVA PEREIRA, J. M.; MARINHO, M. T.; PRADO-SILVA, L.; DO, SANT'ANA, A. S.; DULTRA, L. M.; BARISOL, A.; GRANATO, D. ¹H NMR combined with chemometrics tools for rapid characterization of edible oils and their biological properties. **Industrial Crops and Products**, v. 116, p. 191–200, 2018.

SANTOS, J.S.; BRIZOLA, V.R.A.; GRANATO, D. High-throughput assay comparison and standardization for metal chelating capacity screening: A proposal and application. **Food Chemistry**, v. 214, p. 515–522, 2017.

SAUTEBIN, L.; ROSSI, A.; SERRAINO, I.; DUGO, P.; DI PAOLA, R.; MONDELLO, L.; GENOVESE, T.; BRITTI, D.; PELI, A.; DUGO, G.; CAPUTI, A. P.; CUZZOCREA, S. Effect of Anthocyanins Contained in a Blackberry Extract on the Circulatory Failure and Multiple Organ Dysfunction Caused by Endotoxin in the Rat. **Planta Medica**, v. 70, n. 08, p. 745-752, 2004.

SCHLACHTERMAN, A.; VALLE, F.; WALL, K. M.; AZIOS, N. G.; CASTILLO, L.; MORELL, L.; WASHINGTON, A. V.; CUBANO, L. A.; DHARMAWARDHANE, S. F. Combined Resveratrol, Quercetin, and Catechin Treatment Reduces Breast Tumor Growth in a Nude Mouse Model. **Translational Oncology**, v. 1, n. 1, p. 19–27, 2008.

SERAGLIO, S. K. T.; VALESE, A. C.; DAGUER, H.; BERGAMO, G.; AZEVEDO, M. S.; GONZAGA, L. V.; FETT, R.; COSTA, A. C. O. Development and validation of a LC-ESI-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in honeydew honeys with the diluted-and-shoot approach. **Food Research International**, v. 87, p. 60–67, 2016.

SERRAINO, I.; DUGO, L.; DUGO, P.; MONDELLO, L.; MAZZON, E.; DUGO, G.; CAPUTI, A. P.; CUZZOCREA, S. Protective effects of cyanidin-3-O-glucoside from blackberry extract against peroxynitrite-induced endothelial dysfunction and vascular failure. **Life Sciences**, v. 73, n. 9, p. 1097-1114, 2003.

SHEN, X.; SUN, X.; XIE, Q.; LIU, H.; ZHAO, Y.; PAN, Y.; HWANG, C.; WU, V. C. H. Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis*. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 159–165, 2014.

SIDDIQUE, A. B.; MIZANUR RAHMAN, S. M.; HOSSAIN, M. A. Chemical composition of essential oil by different extraction methods and fatty acid analysis of the leaves of *Stevia Rebaudiana* Bertoni. **Arab. J. Chem.** v. 9, p. S1185-S1189, 2016.

SIES, H. Total antioxidant capacity: appraisal of a concept. **Journal of Nutrition**, v. 137, p. 1493-1495, 2007.

SILVA, R. F. M.; POGAČNIK, L. Polyphenols from food and natural products: Neuroprotection and safety. **Antioxidants**, v. 9, n. 1, p. 61, 2020.

SINGH, T.; SHARMA, S. D.; KATIYAR, S. K. Grape proanthocyanidins induce apoptosis by loss of mitochondrial membrane potential of human non-small cell lung cancer cells in vitro and in vivo. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e27444, 2011.

SINGLETERY, K. W.; STANSBURY, M. J.; GIUSTI, M.; VAN BREEMEN, R. B.; WALLIG, M.; RIMANDO, A. Inhibition of rat mammary tumorigenesis by concord grape juice constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7280–7286, 2003.

SLATER, T. F. Free radical mechanisms in tissue injury. In: *Cell Function and Disease*. **Springer US**, p. 209-218, 1988.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Sequestering Ability of Butylated Hydroxytoluene, Propyl Gallate, Resveratrol, and Vitamins C and E against ABTS, DPPH, and Hydroxyl Free Radicals in Chemical and Biological Systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 1077-1080, 2003.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SOXHLET, F. Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. **Dinglers Polytechnisches Journal**, v. 232, p. 461-465, 1879.

SWANSON, K. S.; GIBSON, G. R.; HUTKINS, R.; REIMER, R. A.; REID, G.; VERBEKE, K.; SCOTT, K. P.; HOLSCHER, H. D.; AZAD, M. B.; DELZENNE, N. M.; SANDERS, M. E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, p. 687-701, 2020.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Surface protection and secondary defense compounds. **Plant physiology**, p. 320-345, 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. Ed. 3, Porto Alegre: **Artmed**, 2009.

TALBOTT, S.H.; HUGHES, K. Suplementos dietéticos para profissionais da saúde. 1ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2008.

TAO, Y.; ZHANG, Z.; SUN, D.-W. Kinetic modeling of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grape marc: Influence of acoustic energy density and temperature. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 4, p. 1461–1469, 2014.

TEIXEIRA, A.; EIRAS-DIAS, J.; CASTELLARIN, S. D.; GEROS, H. Berry phenolics of grapevine under challenging environments. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 9, p. 18711-18739, 2013.

The Plant List, 2013. Version 1.1. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/>. Acesso em: 16.08.2019.

TOMAS, M.; ROCCHETTI, G.; GHISONI, S.; GIUBERTI, G.; CAPANOGLU, E.; LUCINI, L. Effect of different soluble dietary fibres on the phenolic profile of blackberry puree subjected to in vitro gastrointestinal digestion and large intestine fermentation. **Food Research International**, v. 130, p. 108954, 2019.

ULMER, C. Z.; JONES, C. M.; YOST, R. A.; GARRETT, T. J.; BOWDEN, J. A. Optimization of Folch, Bligh-Dyer, and Matyash sample-to-extraction solvent ratios for human plasma-based lipidomics studies. **Analytica Chimica Acta**, v. 1037, p. 351-357, 2018.

VÄISÄNEN, T.; KILPELÄINEN, P.; KITUNEN, V.; LAPPALAINEN, R.; TOMPPONEN, L. Effect of steam treatment on the chemical composition of hemp (*Cannabis sativa* L.) and identification of the extracted carbohydrates and other compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 131, p. 224–233, 2019.

VAN DAM, R. M.; NAIDOO, N.; LANDBERG, R. Dietary flavonoids and the development of type 2 diabetes and cardiovascular diseases: review of recent findings. **Current Opinion in Lipidology**, v. 24, n. 1, p. 25-33, 2013.

VAN HOED, V.; BARBOUCHE, I.; DE CLERCQ, N.; DEWETTINCK, K.; SLAH, M.; LEBER, E.; VERHÉ, R. Influence of filtering of cold pressed berry seed oils on their antioxidant profile and quality characteristics. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1848–1855, 2011.

VILLELA, A. A.; JACCOUD, D. B.; ROSA, L. P.; FREITAS, M. V. Status and prospects of oil palm in the Brazilian Amazon. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 270–278, 2014.

WANG, H.; WANG, J.; QIU, C.; YE, Y.; GUO, X.; CHEN, G.; LI, T.; WANG, Y., FU, X.; LIU, R.H. Comparison of Phytochemical Profiles and Health Benefits in Fiber and Oil Flaxseeds (*Linum usitatissimum* L.). **Food Chemistry**, v. 214, p. 227-230, 2017.

WANG, L.; HUANG, W.; ZHAN, J. Grape Seed Proanthocyanidins Induce Autophagy and Modulate Survivin in HepG2 Cells and Inhibit Xenograft Tumor Growth in Vivo. **Nutrients**, v. 11, n. 12, p. 2983, 2019.

WANG, Y.; WANG, Y.; SHEN, W.; WANG, Y.; CAO, Y.; NUERBULATI, N.; CHEN, W.; LU, G.; XIAO, W.; QI, R. Grape Seed Polyphenols Ameliorated Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis via Suppression of Inflammation and Apoptosis. **Pharmacology**, v. 105, n. 1–2, p. 9–18, 2020.

WEDICK, N. M.; PAN, A.; CASSIDY, A.; RIMM, E. B.; SAMPSON, L.; ROSNER, B.; WILLETT, W.; HU, F. B.; SUN, Q.; VAN DAM, R. M. Dietary flavonoid intakes and risk of type 2 diabetes in US men and women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 95, n. 4, p. 925-933, 2012.

WELI, A. M.; AL-SAADI, H. S.; AL-FUDHAILI, R. S.; HOSSAIN, A.; PUTIT, Z. B.; JASIM, M. K. Cytotoxic and antimicrobial potential of different leaves extracts of *R. fruticosus* used traditionally to treat diabetes. **Toxicology Reports**, v. 7, p. 183–187, 2020.

WU, J. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 4, p. 347–352, 2001.

XIONG, S. L.; ZHENG, Y.; DAI, X.; WANG, Q.; CAO, J.; XIAO, J. Antioxidant and immunoregulatory activity of different polysaccharide fractions from tuber of *Ophiopogon japonicus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1273–1280, 2011.

YAMASHITA, C.; CHUNG, M. M. S.; DOS SANTOS, C.; MAYER, C. R. M.; MORAES, I. C. F.; BRANCO, I. G. Microencapsulation of an anthocyanin-rich blackberry (*Rubus* O. Zannou and I. Koca LWT 158 (2022) 11318411spp.) by-product extract by freeze-drying. **LWT – Food Science and Technology**, v. 84, p. 256–262, 2017.

YANG, C. S.; LANDAU, J. M.; HUANG, M. T.; NEWMARK H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, p. 381-406, 2001.

YU, J.; AHMEDNA, M. Functional Components of Grape Pomace: Their Composition, Biological Properties and Potential Applications. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 48, p. 221-237, 2013.

YU, T-W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, Amsterdam, v.379, n.2, p.201-210, 1997.

YUN, S.; CHU, D.; HE, X.; ZHANG, W.; FENG, C. Protective effects of grape seed proanthocyanidins against iron overload-induced renal oxidative damage in rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 57, p. 126407, 2020.

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.

ZANNOU, O.; KOCA, I. Greener extraction of anthocyanins and antioxidant activity from blackberry (*Rubus* spp) using natural deep eutectic solvents. **Food Science and Technology**, v. 158, p. 113184, 2022.

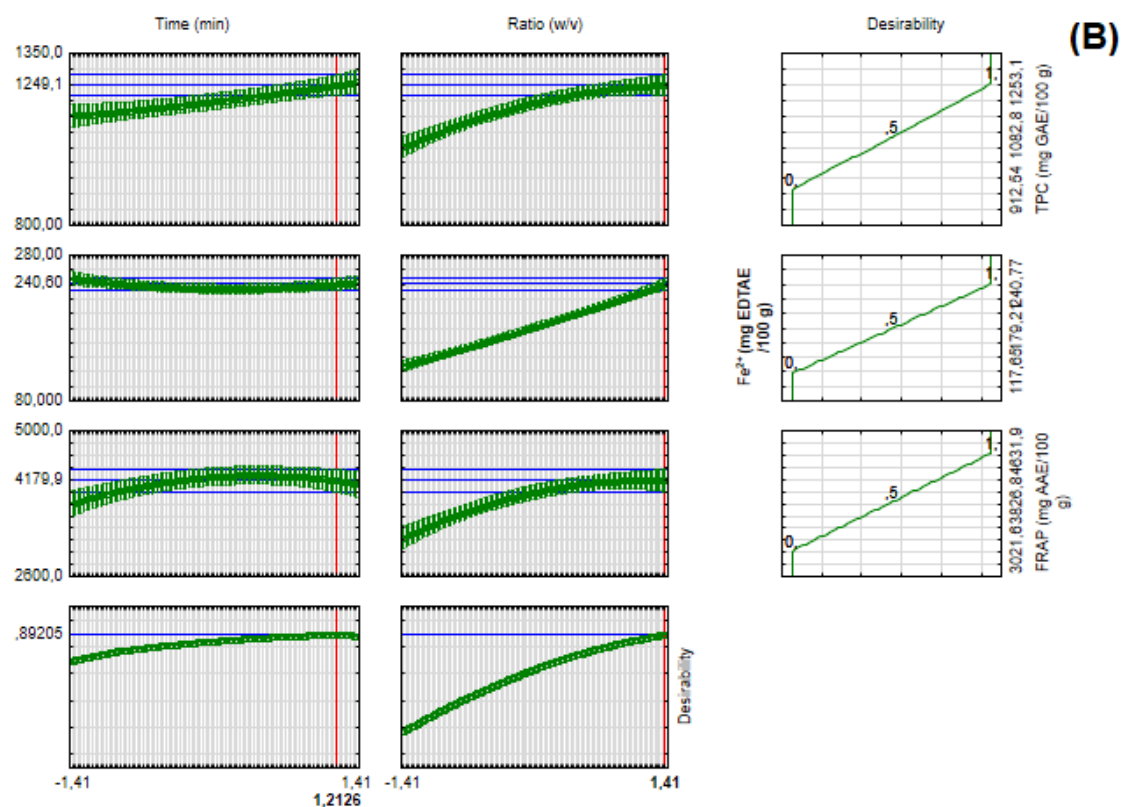
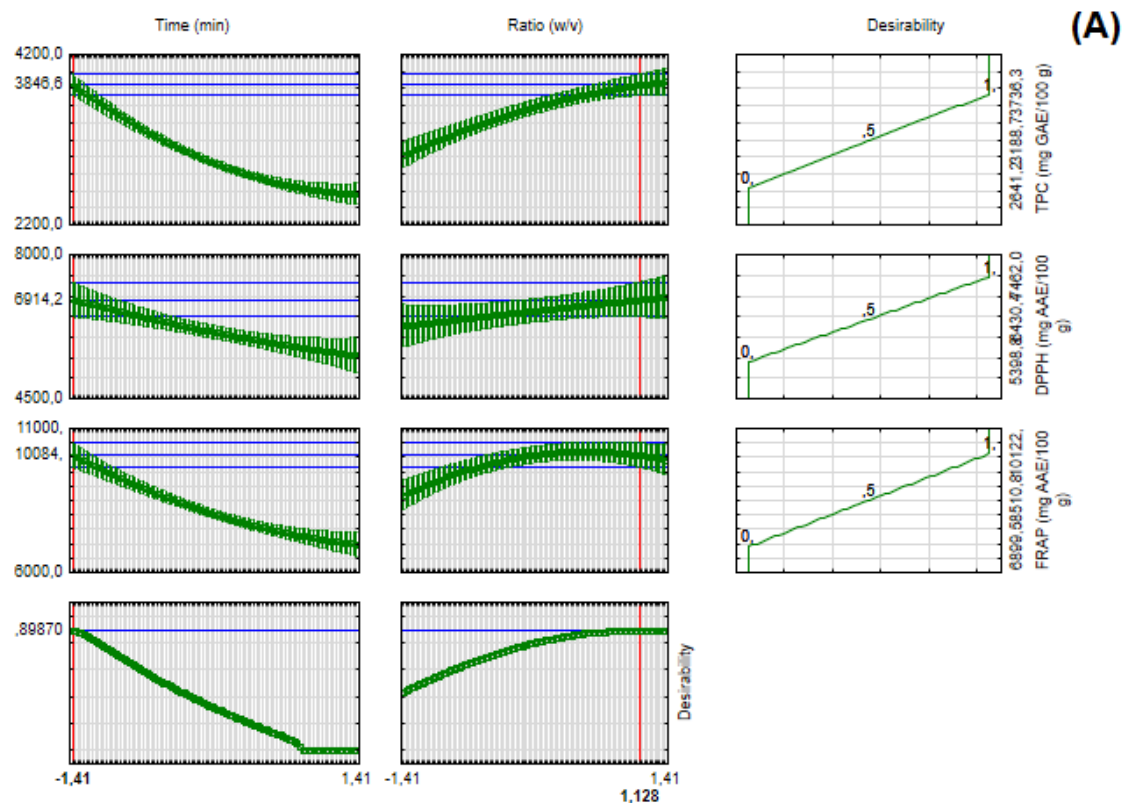
ZHANG, L.; SANTOS, J.S.; CRUZ, T.M.; MARQUES, M.B.; DO CARMO, M.A.V.; AZEVEDO, L.; WANG, Y.; GRANATO, D. Multivariate effects of Chinese keemun black tea grades (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) on the phenolic composition, antioxidant, antihemolytic and cytotoxic/cytoprotection activities. **Food Res. Int.** v. 125, p. 108516, 2019.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555–559, 1999.

ZIA-UL-HAQ, M., RIAZ, M., DE FEO, V., JAAFAR, H.; MOGA, M. *Rubus fruticosus* L.: Constituents, biological activities and health related uses. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 10998–11029, 2014.

ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A.; DEMIATE, I. M.; GRANATO, D. A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Research International**, v. 60, p. 246–254, 2014.

APÊNDICE A - PERFIS PARA VALORES PREVISTOS E DESEJABILIDADE UVA (A) E AMORA (B)



APÊNDICE B - ENSAIOS TESTADOS DE FORMA ALEATÓRIA

Valores codificados		Valores reais	
Tempo (min)	Razão	Tempo (min)	Razão
	Massa/volume		Massa/volume
	(x/s)		(x/s)
-1	-1	40	1;40
-1	1	40	1;60
1	-1	60	1;40
1	1	60	1;60
-1.41	0	35.9	1;50
1.41	0	64.1	1;50
0	-1.41	50	1;35.9
0	1.41	50	1;64.1
0	0	50	1;50
0	0	50	1;50
0	0	50	1;50

APÊNDICE C - PARÂMETROS DE ESPECTROMETRIA DE MASSA PARA ANÁLISE DE CADA COMPOSTO FENÓLICO

(continua)

Gás de cortina (CUR)	25 V
Gás de colisão (CAD)	High
Tensão IonSpray(IS)	Modo negativo -4500 e modo positivo 5500
Temperatura (TEM)	400 °C
Gás de fonte de íons 1 (GS1)	55 V
Gás de fonte de íons 2 (GS2)	55 V
Temperatura forno coluna	40 °C
Volume de injeção	5 µL
Fluxo	0,3 ml/min
0 min	98% A

APÊNDICE C - PARÂMETROS DE ESPECTROMETRIA DE MASSA PARA ANÁLISE DE CADA COMPOSTO FENÓLICO

(conclusão)

0 a 3 min	80 % A
3 a 10 min	10 % A
10 a 11 min	10 % A
11 a 13 min	98 % A
Tempo de equilíbrio	3 min
Fase móvel A	Água 0,1% ácido fórmico
Fase móvel B	Acetonitrila 0,1% ácido fórmico
Coluna	Zorbax Eclipse Plus C ₁₈ column (3.5 µm, 3.0 x 100 mm), Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, USA)
LoQ	ranged from 0.20 to 12.8 µg/L
Faixa de trabalho	25 a 1000 µg/L
HPLC	1290 Infinity HPLC system from Agilent Technologies Deutschland GmbH (Waldbronn, Germany)
Massas	Qtrap 5500 hybrid triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometer from AB Sciex LLC (Framingham, USA)
Referência	Seraglio, 2016
Água ultrapura	Resistividade mínima 18,3 MΩ cm
Acetonitrila	UV/HPLC. êxodo científica Lote: 2108034375
Ácido fórmico	HoneyWell Lote #SZBG2510H