



## **INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SOLVENTES NO CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM EXTRATOS DE CASCAS DE UVA (VITIS VINIFERA) DA VARIEDADE SYRAH**

Euzélia Lima de Souza<sup>1</sup>; Talita Sousa Nascimento<sup>2</sup>; Gabriele de Abreu Barreto<sup>3</sup>; Ingrid Lessa Leal<sup>3</sup>; Bruna Aparecida Souza Machado<sup>3,4</sup>.

<sup>1</sup>SENAI CIMATEC - Programa de Pós-graduação em Gestão e Tecnologia Industrial – Salvador/Ba.

<sup>2</sup>Universidade Federal da Bahia, Escola de Nutrição – Salvador/Ba.

<sup>3</sup>SENAI CIMATEC – Laboratório Biotecnologia e Alimentos – Salvador/ Ba

<sup>4</sup>SENAI CIMATEC – Instituto de Tecnologias da Saúde (ITS) – Salvador/Ba.

**Resumo:** A casca de uva proveniente da indústria de vinho ainda contém expressivas quantidades de compostos fenólicos. Características específicas dos solventes aplicados influenciam diretamente na extração de compostos fenólicos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência de diferentes solventes na obtenção de compostos fenólicos em extratos da casca de uva *Syrah* por cromatografia líquida de alta eficiência. Foram elaborados extratos de cascas de uvas com 3 diferentes solventes (água, álcool de cereais a 50% e 80%), e avaliados utilizando curva padrão com 15 compostos fenólicos. Não foi possível quantificar os compostos fenólicos, porém os cromatogramas sugerem a presença de alguns deles. O solvente que proporcionou melhor interação com a casca de uva foi o álcool de cereais a 50%.

**Palavras-Chave:** antioxidante, resíduo, casca de uva, cromatografia.

## **INFLUENCE OF DIFFERENT SOLVENTS ON THE PHENOLIC COMPOUNDS CONTENT GRAPE EXTRACTS (VITIS VINIFERA) FROM SYRAH VARIETY**

**Abstract:** Grape rind from the wine industry still contains significant amounts of phenolic compounds. Specific characteristics of the applied solvents directly influence the extraction of phenolic compounds. The objective of this work was to evaluate the influence of different solvents on phenolic compounds in Syrah grape husk extracts by high performance liquid chromatography. Grape peel extracts were prepared with 3 different solvents (water, 50% and 80% cereal alcohol), and evaluated using standard curve with 15 phenolic compounds. It was not possible to quantify the phenolic compounds, but the chromatograms suggest the presence of some of them. The solvent that provided the best interaction with grape peel was 50% cereal alcohol.

**Keywords:** antioxidants, residue, grape peel, chromatography.



## 1. INTRODUÇÃO

Diversas pesquisas ao longo do tempo têm demonstrado interesse em estudar os efeitos benéficos à saúde atribuídos aos compostos fenólicos presentes na maioria dos alimentos. Os estudos destacam os múltiplos efeitos biológicos e clínicos relacionados a estes compostos da dieta como papéis antioxidantes, cardioprotetor, anticâncer, anti-bacteriano, anti-virais, vasodilatador, antidiabética e ações anti-inflamatórias [1].

Os compostos fenólicos, constituem um dos maiores grupos de metabolitos secundários das plantas com mais de 8000 já conhecidas. Eles são importantes constituintes dos alimentos. As uvas contem expressivas quantidades desses compostos quando comparada a outras frutas e vegetais [2]. O teor total de fenólicos das cascas de uva variam conforme a cultivar, fatores como topografia, geologia, drenagem, clima, microclima, castas, intervenção humana (*terroir*) [3].

Pesquisas apresentam grande eficácia em reutilização do bagaço da uva por conter expressivas quantidades de fenólicos e antioxidantes. Na casca são encontrados componentes como os flavonóis (quempferol, quercetina e miricetina) [4], as antocianinas (cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina, malvidina), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (ácido cafeiltartárico e o ácido *p*-cumariltartárico), além de uma larga variedade de taninos [5–7].

Para a extração de compostos fenólicos de diversas matrizes, diferentes sistemas de solventes são utilizados [8]. A extração por solventes é o método mais comum para separar antioxidantes naturais. Estes quando em série nos alimentos, com solventes diversificados, pode ser mais eficiente na extração de compostos bioativos, uma vez que leva em conta a diversidade de cada amostra [9]. O sistema solvente utilizado na extração de bagaço de uva influencia diretamente os conteúdos de fenólicos totais, antocianinas e atividade antioxidante dos extratos [6].

O tipo e a polaridade do solvente são características que afetam a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio, aspecto-chave na extração de polifenóis, e conseqüentemente na capacidade antioxidante [10]. Além do rendimento, a escolha do sistema solvente a ser utilizado também influencia na composição do extrato [11].

Considerando a importância dos compostos fenólicos para a saúde humana, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência de diferentes solventes na obtenção de compostos fenólicos em extratos da casca de uva *Syrah* por cromatografia líquida de alta eficiência.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Material e Reagentes

Foram utilizados metanol, DMSO (Sigma-Aldrich Chemical Co. - St. Louis, MO, EUA) e ácido acético (Dinâmica) de grau HPLC, e álcool de cereais (92,8% - Anidrol). Utilizou-se filtro para seringa de *nylon* de 0,20 µm (Agilent Captiva, Califórnia, EUA). Os padrões ácido cafeico (CAS number 331-39-5), ácido gálico (CAS number 149-91-7), ácido trans-cinâmico (CAS number 205-398-1), ácido *p*-cumárico cristalino (CAS number 501-98-4), biochanina A (CAS number 91-80-5), catequina (CAS



number 7295-85-4), epicatequina (CAS number 490-46-0), formononetina (CAS number 485-72-3), isoliquiritigenina (CAS number 961-29-5), miricetina (CAS number 529-44-2), naringenina (CAS number 67604-48-2), quercetina (CAS number 117-39-5), resveratrol (CAS number 501-36-0) e rutina hidratada (CAS number 207671-50-9) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA) e ácido trans-ferúlico (CAS number 537-98-4) da Fluka.

## 2.2. Obtenção dos Extratos

As amostras de bagaço de uva *Syrah* (*Vitis vinifera L.*) utilizadas foram obtidas de indústrias vitivinícolas da região do Vale do São Francisco no mês de agosto/2018. As cascas foram separadas da semente e engaço e mantidas sob congelamento (-20 °C) até o momento de uso. Foram obtidos 3 extratos de casca de uva *Syrah* com variação do solvente: extrato aquoso (EA), extrato de álcool de cereais a 50% (EAC50) e extrato de álcool de cereais a 80% (EAC80). As cascas foram trituradas com o solvente na proporção 1:5 m/v. Em seguida, a mistura foi sonicada (Elma Sonic, S40H, Alemanha), por 30 min/60 °C. Posteriormente, foi homogeneizada em incubadora tipo shaker por 120 min (180 rpm), filtrada e concentrada em concentrador de amostra (Genevac, MiVac Concentrator, Reino Unido), a 50 °C. O extrato foi armazenado em temperatura de congelamento (-27 °C).

## 2.3. Análise Cromatográfica dos Extratos

Para a identificação e quantificação dos compostos (Ácido Cafeico, Ácido Gálico, Ácido *p*-cumárico, Ácido Trans-cinâmico, Ácido Trans-ferúlico, Biochanina A, Catequina, Epicatequina, Formonometina, Isoliquiritigenina, Miricetina, Naringenina, Quercetina, Resveratrol e Rutina Hidratada), inicialmente foram preparadas soluções dos padrões à concentração de 10 mg.L<sup>-1</sup>, os quais foram dissolvidos em metanol de elevada pureza. Soluções metanólicas de extratos de uva também foram preparadas (5500 ppm). As amostras foram filtradas em filtro de nylon de 25mm, 0,20 µm (Agilent Captiva) para injeção em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) (Shimadzu, LC-20AT, Japão) equipado com injetor automático e detector de arranjo de diodo (DAD) (Shimadzu, SPD-M20, Japão). A separação cromatográfica foi adaptada tendo por base o método proposto por Salgueiro & Castro [12] e Cabral et al. [13]. A coluna NUCLEODUR® 100-5 C18 ec (150x4 mm ID; tamanho de partícula de 5 µm) foi utilizada em conjunto com uma pré-coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 4,6x12,5 mm (Agilent, USA).

As condições de análise foram realizadas com um gradiente de eluição com uma fase móvel de ácido acético 5% e metanol em diferentes proporções e com tempo de análise total de 42 minutos (de 0 a 35 min (0-92% B); 35 a 40 min (92-0% B); 40 a 42 min (0% B)). O volume de injeção foi de 20 µL e o fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. O equipamento foi operado à temperatura de 40±2 °C. A leitura do detector de arranjo de diodos foi ajustada na faixa de 190 a 800 nm e a aquisição cromatográfica foi definida entre 260 e 370 nm. A identificação dos compostos foi realizada através da comparação do tempo de retenção e do espectro ultravioleta entre as amostras e os padrões (Tabela 1), a faixa de trabalho dos compostos foi de 0,5 a 30 mg.L<sup>-1</sup>.

**Tabela 1.** Limite de detecção e quantificação dos compostos ativos por HPLC DAD

Composto Fenólico	tR (min)	$\lambda$ (nm)	Limite de Detecção (mg.g <sup>-1</sup> )	Limite de Quantificação (mg.g <sup>-1</sup> )
Ácido Cafeico	8,20	320	0,29	0,96
Ácido Gálico	2,32	280	0,96	3,21
Ácido <i>p</i> -cumárico	10,35	300	1,04	3,48
Ácido Trans-cinâmico	16,02	280	0,28	0,93
Ácido Trans-Ferúlico	11,33	320	1,99	6,64
Biochanina A	22,00	280	0,41	1,38
Catequina	6,59	280	1,07	3,58
Epicatequina	8,45	280	0,81	2,69
Formononetina	19,28	300	0,28	0,94
Isoliquiritigenina	18,70	370	0,34	1,14
Miricetina	13,06	370	0,72	2,39
Naringenina	16,54	280	0,24	0,79
Quercetina	15,30	370	0,77	2,57
Resveratrol	13,79	300	0,28	0,93
Rutina Hidratada	11,23	260	0,29	0,97

tR=tempo de retenção;  $\lambda$ =comprimento de onda; LD=limite de detecção; LQ=limite de quantificação.

Com o objetivo de garantir a confiabilidade dos resultados obtidos, foi realizada uma validação de acordo com as metodologias da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [14] e do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) [15]. Esta análise foi realizada de acordo com os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, limites de detecção e limites de quantificação.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos fenólicos investigados nos diferentes extratos de casca uvas são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Avaliação qualitativa dos compostos ativos presentes em extratos de uva Shiraz obtidos com diferentes solventes

Composto fenólico	EA	EAC50	EAC80
Ácido Cafeico	<LD	<LQ	<LQ
Ácido Gálico	ND	<LD	<LD
Ácido <i>p</i> -cumárico	<LD	<LD	<LD
Ácido Trans-cinâmico	<LD	<LQ	<LD
Ácido Trans-Ferúlico	ND	<LD	<LD
Biochanina A	ND	ND	<LD
Catequina	<LD	ND	<LD
Epicatequina	<LD	<LD	<LD
Formononetina	ND	ND	ND
Isoliquiritigenina	ND	ND	ND
Miricetina	<LD	<LQ	<LQ
Naringenina	<LD	<LD	<LD
Quercetina	ND	ND	ND



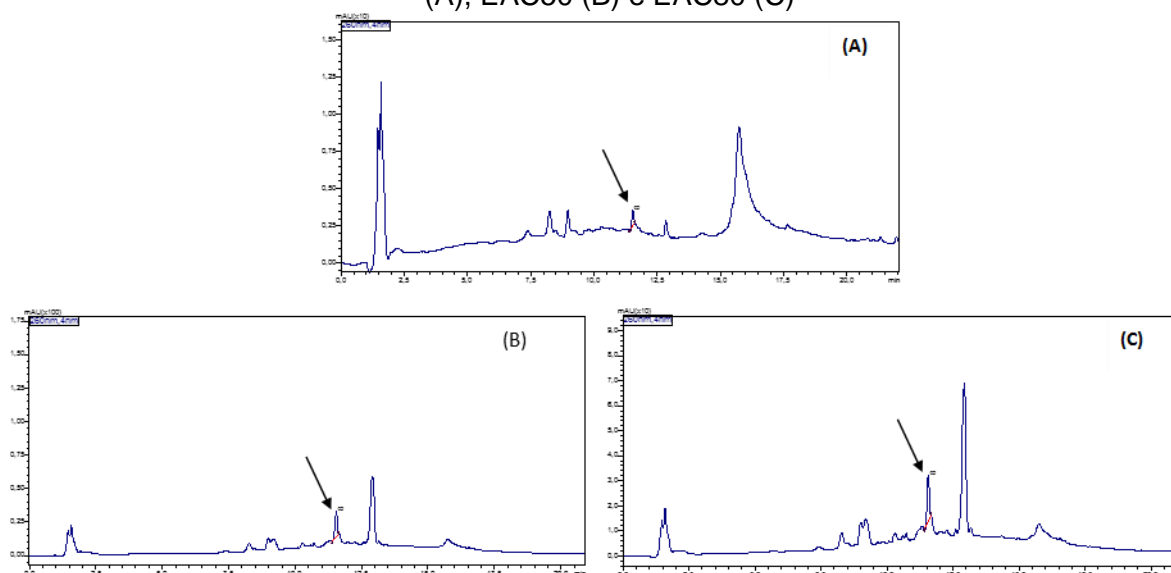
Resveratrol	ND	<LD	<LD
Rutina Hidratada	<LD	<LQ	<LQ

ND= Não detectado; <LD= abaixo do limite de detecção; <LQ= abaixo do limite de quantificação

Ressalta-se que apesar de nenhum composto ser quantificado, os extratos apresentaram em seus cromatogramas picos que sugerem a presença de alguns compostos em sua composição fitoquímica, sendo estes sinalizados com <LD (abaixo do limite de detecção) na Tabela 2.

De acordo com os resultados apresentados, sugere-se que o solvente que proporcionou melhor interação com a casca de uva foi o álcool de cereais a 50%. Abaixo tem-se o cromatograma (Figura 1) para a rutina no comprimento de onda de 260nm.

**Figura 1.** Cromatograma dos extratos de uva obtidos com diferentes solventes. EA (A), EAC50 (B) e EAC80 (C)



A miricetina é um isoflavanol com atividade antioxidante, é comumente distribuída em frutas, vegetais, nozes, frutas vermelhas, chá e vinho tinto [16]. Acredita-se que mirecetina apresenta múltiplos efeitos terapêuticos, potenciais propriedades para saúde como antioxidante [17,18], anti-carcinogênicas, anti-inflamatórias, anti-ateroscleróticas, anti-trombóticas, anti-diabéticas e antivirais [19], exercem efeitos anti- e prooxidantes, bem como exibem efeitos mutagênicos e potencial anti-mutagênico, [18,20–22].

A rutina, flavona natural, apresenta diversas propriedades, incluindo antialérgica, anti-inflamatória, antitumoral e principalmente antioxidante, antidiarreico, antihipertensivo, antimutagênica e proteção contra o estresse nitrosativo e lesão hepatocelular [18,23,24].

Wang et al. [25] ao analisar extrato de uva, obtidos com soluções de HCl e metanol (1:1) e acetona (70%) e analisados pelo mesmo método cromatográfico encontrou valores de  $34,8 \pm 3,3 \mu\text{g}.\text{mg}$  e  $9,0 \pm 0,8 \mu\text{g}.\text{mg}$  para miricetina e rutina.



#### 4. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que os extratos apresentam compostos fenólicos em sua composição, entretanto, a concentração analisada das amostras foi relativamente baixa em comparação com curva analítica utilizada para o método de análise. Desta forma, infere-se que a matriz deste estudo (casca de uva) possui compostos fitoquímicos, porém uma nova análise com uma maior concentração faz-se necessária para quantificar efetivamente estas substâncias.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPQ pela bolsa concedida e ao SENAI CIMATEC, em especial ao Laboratório Integrado e Aplicado em Química (LIPAQ) e ao Laboratório de Biotecnologia e Alimentos.

#### 5. REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup> Pietta P-G. Reviews Flavonoids as Antioxidants. **J Nat Prod.** 2000;63,: 1035–1042. doi:10.1021/np9904509
- <sup>2</sup> Vedana MIS, Ziemer C, Miguel OG, Portella AC, Candico LMB. Efeito Do Processamento Na Atividade Antioxidante De Uva. **Alim Nutr.** 2008;19: 159–165.
- <sup>3</sup> Lingua MS, Fabani MP, Wunderlin DA, Baroni M V. In vivo antioxidant activity of grape, pomace and wine from three red varieties grown in Argentina: Its relationship to phenolic profile. **J Funct Foods.** 2016;20: 332–345.
- <sup>4</sup> Beres C, Simas-Tosin FF, Cabezudo I, Freitas SP, Iacomini M, Mellinger-Silva C, et al. Antioxidant dietary fibre recovery from Brazilian Pinot noir grape pomace. **Food Chem J.** 2016;201: 145–152.
- <sup>5</sup> Drosou C, Kyriakopoulou K, Bimpilas A, Tsimogiannis D, Krokida M. A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. **Ind Crops Prod.** 2015;75: 141–149.
- <sup>6</sup> Rockenbach II. **Compostos fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante do Bagaço da vinificação de uvas tintas (Vitis vinifera L. e Vitis labrusca L.).** .112 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.
- <sup>7</sup> Caldas TW, Mazza KEL, Teles ASC, Mattos GN, Brígida AIS, Conte-Junior CA, et al. Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. **Ind Crops Prod.** 2018;111: 86–91.
- <sup>8</sup> Chavan U., Shahidi F, Naczki M. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. **Food Chem.** 2001;75: 509–512.
- <sup>9</sup> Litwinienko G, Ingold KU. Abnormal Solvent Effects on Hydrogen Atom Abstraction. 3. Novel Kinetics in Sequential Proton Loss Electron Transfer Chemistry. **J Org Chem.** 2005;70: 8982–8990.



- <sup>10</sup> Rockenbach II, Lessa Da Silva G, Rodrigues E, Kuskoski EM, Fett R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciênc Tecnol Aliment.** 2008;28: 238–244.
- <sup>11</sup> Moure A, Cruz JM, Franco D, Domínguez JM, Sineiro J, Domínguez H, et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chem.** 2001;72: 145–171.
- <sup>12</sup> Salgueiro FB, Castro RN. Comparison between chemical composition and antioxidant activity of different extracts of green propolis. **Quim Nova.** 2016;39: 1192–1199.
- <sup>13</sup> Cabral ISR, Oldoni TLC, Prado A, Bezerra RMN, Alencar MS. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Quim Nova.** 2009;32: 1523–1527.
- <sup>14</sup> BRASIL. Resolução no 899, de 29 de maio de 2003: **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** 2003.
- <sup>15</sup> BRASIL. **Diretrizes para Validação de Métodos Analíticos.** 2011.
- <sup>16</sup> Seo J, Lee D, Arasu M, Wu Q, Suzuki T, Yoon Y, et al. Quantitative differentiation of phenolic compounds in different varieties of buckwheat cultivars from China, Japan and Korea. **J Agric Chem Environ.** 2013;2: 109–116.
- <sup>17</sup> Chen W, Feng L, Shen Y, Su H, Li Y, Zhuang J, et al. Myricitrin inhibits acrylamide-mediated cytotoxicity in human caco-2 cells by preventing oxidative stress. **Biomed Res Int.** 2013; 1–7.
- <sup>18</sup> Domitrovic R, Rashed K, Cvijanovic O, Vladimir-Kneževi S, Škoda M, Višnic A. Myricitrin exhibits antioxidant, anti-inflammatory and antifibrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice. **Chem Biol Interact.** 2015;230: 21–29.
- <sup>19</sup> Ong KC, Khoo H-E. Biological Effects of Myricetin. **Gen Pharmac.** 1997;29: 121–126.
- <sup>20</sup> Kim HH, Kim DH, Kim MH, Oh MH, Kim SR, Park KJ, et al. Flavonoid constituents in the leaves of *Myrica rubra* sieb. et zucc. with anti-inflammatory activity. **Arch Pharm Res.** 2013;36: 1533–1540.
- <sup>21</sup> Meotti FC, Missau C, Ferreira J, Pizzolatti G, Mizuzaki C, Nogueira CW, et al. Anti-allodynic property of flavonoid myricitrin in models of persistent inflammatory and neuropathic pain in mice. **Biochem Pharmacol.** 2006;72: 1707–1713.
- <sup>22</sup> Shimosaki S, Tsurunaga Y, Itamura H, Nakamura M. Anti-allergic effect of the flavonoid myricitrin from *Myrica rubra* leaf extracts invitro and invivo. **Nat Prod Res.** 2011;25: 374–380.
- <sup>23</sup> Moawad Mahmoud A. Influence of rutin on biochemical alterations in hyperammonemia in rats. **Exp Toxicol Pathol.** 2012;64: 783–789.
- <sup>24</sup> Su K, Yu C, Chen Y, Huang Y, Che C, Hsueh F, et al. Rutin, a flavonoid and principal component of *Saussurea involucreta*, attenuates physical fatigue in a forced swimming mouse model. **Int J Med Sci.** 2014;11: 528–537.
- <sup>25</sup> Wang S, Mateos R, Goya L, Amigo-Benavent M, Sarriá B, Bravo L. A phenolic



V SIINTEC

INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INNOVATION AND TECHNOLOGY  
SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INOVAÇÃO E TECNOLOGIA

CIRCULAR ECONOMY | ECONOMIA CIRCULAR

extract from grape by-products and its main hydroxybenzoic acids protect Caco-2 cells against pro-oxidant induced toxicity. **Food Chem Toxicol.** 2016;88: 65–74.