

Andreia Filipa Cordeiro Vilela

**Importância das Castas de Viosinho e Roriz como possíveis fontes de compostos
Antioxidantes e Antimicrobianos**

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2023

Andreia Filipa Cordeiro Vilela

**Importância das Castas de Viosinho e Roriz como possíveis fontes de compostos
Antioxidantes e Antimicrobianos**

Faculdade Ciências da Saúde

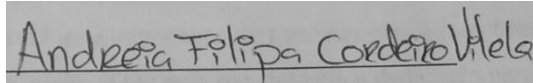
Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2023

Andreia Filipa Cordeiro Vilela

Importância das Castas de Viosinho e Roriz como possíveis fontes de compostos Anti-oxidantes e Antimicrobianos

Atesto á originalidade do trabalho,

A rectangular box containing a handwritten signature in black ink that reads "Andreia Filipa Cordeiro Vilela".

(Andreia Filipa Cordeiro Vilela)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Professora Doutora Maria de Fátima Araújo Magalhães Cerqueira

Coorientadora: Professora Doutora Ana Cristina Mendes Ferreira da Vinha

Porto, 2023

RESUMO

Vitis vinifera é considerada uma das plantas mais cultivadas em Portugal. Esta apresenta-se como uma fonte vital de compostos com importante atividade biológica, obtidos a partir do bagaço da uva, folhas e sementes. Trabalhos recentes demonstraram que os componentes da videira contêm na sua composição uma série de compostos que lhes conferem que lhes conferem atividades importantes ao nível da saúde. A União Europeia incentiva a utilização dos subprodutos agroalimentares, para obter compostos bioativos com aplicação na indústria farmacêutica e cosmética, para sobrevalorização deste material vegetal, isto devido à presença de polifenóis que apresentam diferentes propriedades fisiológicas associadas, tais como antioxidante, cardioprotetora, antitumoral, antiinflamatória e antimicrobiana, o que despertou um interesse crescente da comunidade científica. As várias bases de dados científicos e mecanismos de busca, como PubMed, Elsevier, Google Scholar, SCAP, ADIVD, NCCLS e MDPI, fornecem várias informações de apoio a esta dissertação sobre as propriedades antioxidantes e antimicrobianas de *Vitis vinifera*. Neste projeto procedeu-se ao estudo da atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos aquosos, etanólicos e hidroalcoólicos de engaços de videira de dois tipos de castas nacionais: Casta de Viosinho e Casta de Roriz. Para este trabalho, recorreremos as dois diferentes métodos usualmente utilizados na pesquisa de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos vegetais, tais como Método de Difusão em Agar por Poço e Método de Microdiluição (Norma CLSI - (M27-A2, 2002; M7-A6, 2003)). Nesta pesquisa, ainda, foram avaliados os compostos fenólicos e flavonoides presentes nos extratos e, ainda, atividade antioxidante dos extratos por espectrofotometria.

Palavras-chave: Antifúngicos, *Candida sp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, Antibacterianos, Viosinho, Roriz, Extratos vegetais

ABSTRACT

Vitis vinifera is considered one of the most cultivated plants in Portugal. This presents itself as a vital source of compounds with important biological activity, obtained from grape pomace, leaves and seeds. Recent work has shown that the components of the vine contain in their composition a series of compounds that give them important activities in terms of health. The European Union encourages the use of agro-food by-products, to obtain bioactive compounds with application in the pharmaceutical and cosmetic industry, to overvalue this plant material, due to the presence of polyphenols that have different associated physiological properties, such as antioxidant, cardioprotective, antitumor, anti-inflammatory and antimicrobial, which aroused a growing interest in the scientific community. The various scientific databases and search engines, such as PubMed, Elsevier, Google Scholar, SCAP, ADIVD, NCCLS and MDPI, provide a lot of information to support this dissertation on the antioxidant and antimicrobial properties of *Vitis vinifera*. In this project, we proceeded to study the antioxidant and antimicrobial activity of aqueous, ethanolic and hydroalcoholic extracts of vine stalks from two types of national grape varieties: Casta de Viosinho and Casta de Roriz. For this work, we resorted to two different methods usually used in the research of new antimicrobial agents from plant extracts, such as the Agar Diffusion Method per Well and the Microdilution Method. (CLSI standard - (M27-A2, 2002; M7-A6, 2003)). In this research, the phenolic compounds and flavonoids present in the extracts were also evaluated, as well as the antioxidant activity of the extracts by spectrophotometry.

Keywords: Antifungals, *Candida sp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, Antibacterials, Viosinho, Roriz, Plant Extracts

Agradecimentos

A Dissertação de Mestrado inclui uma trajetória repleta de inúmeros desafios, tristezas, dificuldades, alegrias e muitas adversidades pelo caminho, mas apesar do processo solitário a que qualquer investigador se submete, reúne contributos de várias pessoas, imprescindíveis para encontrar o melhor rumo em cada momento desta etapa.

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais e ao meu namorado pelo apoio e coragem que me transmitiram nos momentos bons e menos bons ao longo do curso, assim como por toda a perseverança e esforço para que eu concluísse o mesmo. Agradeço também em especial aos meus sogros, padrinhos e tios por todo o carinho e incentivo para concluir o curso. Neste seguimento, agradeço à Joana Ferreira por ser a melhor amiga que a faculdade me trouxe e por ter sido a melhor pessoa para me acompanhar neste percurso tão emocionante e gratificante.

Agradeço à Universidade Fernando Pessoa e a todos os docentes que me foram acompanhando ao longo destes 5 anos, por todos os conhecimentos transmitidos e experiências vivenciadas.

Também presto o meu maior agradecimento à Professora Doutora Fátima Cerqueira, como minha orientadora, por toda a sua paciência e incentivo para nunca desistir e, também, por toda a dedicação ao longo deste trabalho experimental. Agradeço por último, à Professora Doutora Ana Vinha, como minha coorientadora, por toda a informação transmitida e executada ao longo do projeto.

Gostaria de agradecer também à Doutora Catarina Barbosa da Associação Para o Desenvolvimento da Viticultura Duriense (ADVID) que me ajudou relativamente à pesquisa das castas em estudo neste projeto e me forneceu parte dos artigos para elaboração do mesmo. Obrigada pelo apoio e incentivo por transmitir à população portuguesa a importância das Castas cultivadas em Portugal ao nível da saúde.

A todos o meu muito obrigada!

ÍNDICE GERAL

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
Agradecimentos	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS	xiii
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. Contexto teórico.....	1
1.2. Motivação	10
1.3. Objetivos.....	10
II. MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.1. Amostras dos Engaços	11
2.2. Reagentes e Padrões.....	11
2.3. Preparação dos Extratos dos Engaços.....	12
2.4. Determinação dos Compostos Fenólicos Totais	12
2.5. Determinação dos Flavonóides Totais	13
2.6. Determinação da Atividade Antioxidante.....	13
2.6.1. Método DPPH	13
2.6.2. Método FRAP	14
2.7. Microrganismos	15

Importância das Castas de Viosinho e Roriz como possíveis fontes de compostos Antioxidantes e Antimicrobianos

2.8. Avaliação da Atividade Antifúngica pelo Método de Difusão em Agar por Poço	15
2.9. Método de Microdiluição em Caldo	16
2.9.1. Avaliação da Atividade Antifúngica	16
2.9.2. Avaliação da Atividade Antibacteriana.....	17
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
3.1. Teores de Fenólicos Totais (FT) e Flavonóides Totais (FLT).....	19
3.2. Atividade Antioxidante pelos métodos FRAP e DPPH.....	21
3.3. Atividade Antifúngica pelo Método de Difusão em Agar por Poço.....	23
3.4. Atividade Antifúngica e Antibacteriana pelo Método de Microdiluição em Caldo	26
IV. CONCLUSÃO	32
V. BIBLIOGRAFIA	34

Importância das Castas de Viosinho e Roriz como possíveis fontes de compostos Antioxidantes e Antimicrobianos

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Engaço da <i>Vitis vinífera</i>	3
Figura 2. Placa com <i>C. albicans</i> exposta segundo a técnica aos Extratos Etanólicos das Castas de Viosinho e Roriz	24
Figura 3. Placa com <i>C. krusei</i> exposta segundo a técnica aos Extratos Etanólicos das Castas de Viosinho e Roriz	24
Figura 4. Placa representando as inibições obtidas para solventes extratores (controlo de atividade do solvente) em <i>C. albicans</i>	25
Figura 5. Placa representando as inibições obtidas para solventes extratores (controlo de atividade do solvente) em <i>C. krusei</i>	25
Figura 6. Placa de <i>C. albicans</i>	27
Figura 7. Placa de <i>C. krusei</i>	27
Figura 8. Placa de <i>E. coli</i>	28
Figura 9. Placa de <i>S. aureus</i>	29

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Teor de compostos bioativos presentes nos extratos aquosos, etanólicos e hidroalcoólicos das Castas de Viosinho e Roriz. Os teores de fenólicos totais (FT) e de flavonóides totais (FLT) estão expressos em mg/100g de extrato seco.....	19
Tabela 2. Atividade antioxidante presente nos extratos de engaçõ das Castas de Viosinho e Roriz pelos métodos FRAP e DPPH estão expressos em $\mu\text{mol}/100\text{g}$ de amostra seca.....	21
Tabela 3. Média da medida dos halo de inibição dado pelos Extratos Etanólicos da Casta de Viosinho e Roriz	23
Tabela 4. Concentração Mínima Inibitória (CMI) em $\mu\text{g}/\text{mL}$ da atividade antifúngica	27
Tabela 5. Concentração Mínima Inibitória (CMI) em $\mu\text{g}/\text{mL}$ da atividade antibacteriana	28

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

ADVID: Associação Para o Desenvolvimento da Viticultura Duriense

CLSI: Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (do inglês *Clinical and Laboratory Standards Institute*)

CMI: Concentração Mínima Inibitória

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPPH: Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

FLT: Flavonóides Totais

FRAP: Poder antioxidante da redução do ferro (do inglês *Ferric reducing antioxidant power assay*)

FT: Fenólicos Totais

HIV: Vírus de Imunodeficiência Humana

MH II: Mueller-Hinton II

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

OIV: Organização Internacional da Vinha e do Vinho

SDA: Sabouraud dextrose agar

SDB: Sabouraud dextrose broth

TPTZ: Solução Tripiridiltriazina (2,4,6-Tris(2-pyriduy1)-s-triazine)

UFP: Universidade Fernando Pessoa

I. INTRODUÇÃO

1.1. Contexto teórico

A vitivinicultura tem uma ligação histórica a Portugal como atividade agrícola de grande importância aos níveis social e económico. Segundo dados reportados pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV), no ano 2021, a produção global total de vinho foi estimada em cerca de 250 milhões de hectolitros (OIV, 2022). Ainda segundo a OIV, no decurso da vinificação, 30% da quantidade total de uvas correspondem a subprodutos vitivinícolas que representam aproximadamente 20 milhões de toneladas, dos quais 50% correspondem à União Europeia, ou seja, 10 milhões dos resíduos são produzidos por países que integram a União Europeia. Assim, neste propósito, há uma necessidade de valorizar subprodutos vitivinícolas e resíduos resultantes da produção de vinho como forma de reforçar o conceito de sustentabilidade. Na verdade, as “*Boas Práticas de Utilização Eficiente de Recursos e Valorização de Resíduos e Subprodutos Agroalimentares*”, bem como a descrição dos seus potenciais como ingrediente e/ou aditivo para as diferentes indústrias, constitui um dos objetivos principais de uma economia sustentável (Kazakova *et al.*, 2022; Niculescu *et al.*, 2023).

Os resíduos gerados no setor agroalimentar são variados e a maioria destes apresentam teores elevados de compostos bioativos, tornando-os matéria-prima de baixo custo e cuja inclusão em diferentes indústrias (alimentar, farmacêutica, cosmética, química) se torna uma alternativa apelativa, quer a nível económico, como na promoção da saúde pública (Leal *et al.*, 2020; Simonetti *et al.*, 2020). No que toca ao setor vinícola, os principais fluxos de resíduos com maior interesse são o bagaço da uva e as borras do vinho. O bagaço da uva é o resíduo originado após a prensagem de uvas para produzir mosto ou vinho. É composto por caules, peles e sementes. Durante o processo de vinificação, uma grande quantidade de bagaço é gerada com valorização valiosa devido a constituir uma importante fonte de produtos de valor agregado como compostos fenólicos, principalmente flavonóides, ácidos fenólicos e estilbenos (Leal *et al.*, 2020; Simonetti *et al.*, 2020).

A uva de *Vitis vinifera* é um dos frutos que retém grandes quantidades de compostos fenólicos. A reatividade destes compostos deve-se ao carácter ácido da função fenólica e ao carácter nucleófilo do anel de benzeno. A concentração de compostos fenólicos na uva

está sujeita a vários fatores: temperatura, espécie e tamanho e maturação do bago. Com formação deste, aumenta a concentração de compostos fenólicos (Barros *et al.*, 2014). É um dos alimentos mais agradavelmente comestíveis, tendo muitas propriedades nutricionais e medicinais confirmadas para os consumidores (Sharma *et al.*, 2021). A uva é uma ótima fonte de água (82%), carboidratos (12–18%), proteínas (0,5– 0,6%) e gordura (0,3– 0,4%). Além disso, a uva contém quantidades notáveis de potássio (0,1–0,2%), vitamina C (0,01–0,02%), vitamina A (0,001– 0,0015%) e também possui uma pequena quantidade de cálcio (0,01–0,02%) e fósforo (0,08–0,01%) (Sharma *et al.*, 2021).

Sendo o principal constituinte de *Vitis vinifera* o resveratrol, um polifenol, que permite proporcionar estes efeitos positivos na saúde, tem sido alvo de investigação pela sua capacidade de inibição do crescimento de bactérias e fungos e também pela sua capacidade sinérgica com antibióticos convencionais (Averilla *et al.*, 2019). O resveratrol é sintetizado pela videira como um mecanismo de defesa em resposta ao ataque microbiano, toxinas, infecções ou radiação UV. Exerce também a capacidade de alterar a expressão de fatores de virulência dos microrganismos, reduzindo a motilidade dos microrganismos e ainda a sua capacidade de formação de biofilmes (Vestergaard *et al.*, 2019).

Os produtos extraídos a partir de diversas partes da videira, nomeadamente engaço, folhas, pele, grainhas e bagaço, vêm sendo alvo de estudos que demonstram a importância da sua utilização e efeitos benéficos para a saúde, principalmente na prevenção de doenças cardiovasculares, cancro, diabetes, desordens intestinais, doenças inflamatórias e hemorragias (Moldovan *et al.*, 2020). Estes compostos derivados da videira possuem polifenóis na sua constituição o que permite retardar ou promover a inibição da oxidação de substratos (Dani *et al.*, 2010). Os polifenóis tem várias atividades fisiológicas dependentes dos seus compostos bioativos, como por exemplo antioxidante e antimicrobiana (Galiniak *et al.*, 2019). Posto isto, o engaço apresenta elevada concentração de polifenóis e minerais, a folha compostos fenólicos e elevada atividade antioxidante, as grainhas um óleo rico em ácidos gordos e derivados da família da Vitamina E, e o extrato da película e grainha contem compostos antioxidantes com potencial para conservação de alimentos (Soares *et al.*, 2020).

O engaço, que constitui um resíduo lenho celulósico, corresponde a quase 25% do total de subprodutos e é o primeiro subproduto resultante do processo de vinificação (**Figura 1**). Este é uma estrutura ligada ao pedúnculo que se divide em ramificações mais finas onde podemos encontrar os bagos das uvas, cuja função é levar água e sais minerais aos bagos (Moldovan *et al.*, 2020). Este produto de vinificação é o menos valorizado de todos os subprodutos gerados e o mais rico em fontes de compostos fenólicos (Leala *et al.*, 2020).



Figura 1. Engaço da *Vitis vinifera*

Portugal é um dos países com maior número de castas nacionais, cerca de 250, estando esta diversidade centrada maioritariamente no norte do país (Lima *et al.*, 2017). Duas dessas foram estudadas neste trabalho experimental, concretamente, as Castas de Roriz e Viosinho.

A Casta Viosinho, é uma casta de vinhas brancas velhas do Douro, bastante bem estruturada a nível de acidez e açúcar proporcionando um aroma floral, dado pela concentração elevada de álcool fenético, potenciando o processo fermentativo e, conseqüentemente, o seu elevado teor alcoólico. É também uma casta de maturação precoce e com sensibilidade ao oídio e podridão. Possui, ainda, baixa concentração de terpenos livres e elevada concentração de dietil succinato (aroma de fermentação) (Vilela *et al.*, 2016). Está comprovado que o engaço desta casta apresenta atividade antioxidante elevada e bioatividade contra bactérias Gram-positivo, sendo estas propriedades associadas com a sua composição química, nomeadamente, compostos como proantocianidinas monoméricas, catequinas e flavonóides e ainda derivados de ácidos hidroxicinâmicos e antocianinas (Schwartz *et al.*, 2020).

A Casta Roriz, também denominada de Casta Aragonez, é originária do norte de Espanha e cultivada em Portugal no Douro e no Alentejo. O seu vinho corrente e de qualidade, tem elevado teor alcoólico, baixa acidez e é indicado para envelhecer, sendo muito resistente à oxidação (Soares *et al.*, 2020). Estas características permitem estabilizar a cor e reduzir defeitos existentes no vinho contribuindo assim para a complexidade aromática e estrutural. É também uma casta que revela alguma sensibilidade ao míldio, oídio e escorriose (Soares *et al.*, 2020). Esta casta, sendo uma casta de vinho tinto, tem maior concentração de resveratrol do que castas de vinhos brancos, como é o caso da Casta de Viosinho (Vestergaard *et al.*, 2019).

A preparação de ingredientes alimentares e alguns produtos farmacêuticos é cada vez mais realizada a partir da extração de compostos bioativos de produtos naturais. Acredita-se que a presença dos polifenóis nos diferentes subprodutos da videira (*Vitis vinifera*) podem ser uma importante fonte de vários compostos bioativos que sejam importantes de levar a investigação ao nível da saúde. Sendo que, os principais compostos fitoquímicos são estilbenoides, compostos fenólicos, ácidos aromáticos (ácido hidroxicinâmico e hidroxibenzóico), flavonóides e proantocianidinas (Prusova *et al.*, 2020). A preparação dos extratos varia significativamente com as condições de extração utilizadas, ou seja, com a escolha do solvente incluindo avaliação da polaridade, temperatura e tempo de extração (Costa *et al.*, 2018). A eficácia deste processo depende, também, do tipo de matriz e das propriedades químicas dos fenólicos, incluindo estrutura molecular, polaridade, concentração e número de anéis aromáticos, tudo isto afeta as proporções de ácidos fenólicos, flavonóides, antocianinas e proantocianidinas a serem extraídos. Por este motivo, torna-se difícil de escolher um único método de extração, separação e purificação de compostos fenólicos (Simonetti *et al.*, 2020).

Os compostos fenólicos são uma das famílias químicas mais relevantes encontradas nas plantas. No entanto, o conteúdo de compostos bioativos é muito variável, podendo ocorrer oscilações qualitativas e quantitativas entre diferentes espécies botânicas e/ou na mesma espécie vegetal. Esta diferença ocorre maioritariamente devido a muitos fatores intrínsecos e extrínsecos, incluindo a variação de retenção dos compostos bioativos nos diferentes órgãos vegetais da mesma planta, no estágio fenológico da planta, fatores ambientais abióticos e bióticos, bem como o local de cultivo, exposição à radiação solar, temperatura,

stresse hídrico, salinidade do solo e predadores (Cirak *et al.*, 2019). Outros estudos referem que os teores de compostos bioativos na planta, independentemente do órgão vegetal, são influenciados pelo “background” genético das culturas (Kaushik *et al.*, 2017; Nyadanu *et al.*, 2020) As práticas agrícolas e a forma de colheita também podem afetar a composição fenólica da variedade vegetal (Rouxinol *et al.*, 2023). Por exemplo, Costa *et al.* (2014) estudaram a influência das condições atmosféricas na qualidade da baga de uva em três diferentes regiões de Portugal (Alentejo, Douro e Dão) e observaram que altas temperaturas tendem a diminuir o peso da baga, a acidez titulável da mesma (substância alcalina), aumentando o conteúdo fenólico e a sua acidez. Estes autores também mencionaram que a variação do perfil químico da planta em si é influenciada pela precipitação, latitude e altitude (Costa *et al.*, 2014b).

Os benefícios da uva e do vinho para a saúde pública incluem a ingestão de vinho tinto e a sua uva tendo as suas vantagens sido associadas essencialmente á sua atividade antioxidante. O resveratrol, pode ser incluído em suplementos alimentares e também na cosmética como reafirmante e nutritivo para a pele, cabelo e unhas. Dani e colaboradores com o objetivo de provar que o consumo destas substâncias antioxidantes, nomeadamente os compostos fenólicos, auxiliam no combate dos radicais livres e previnem doenças degenerativas eles testaram a sua atividade como efeito neuroprotetor (Dani *et al.*, 2010). Como exemplo da utilização dos produtos da videira como promotores de saúde, Maia e seus colaboradores relataram a utilização das folhas de videira frescas e salgadas como alimento ou como suplemento alimentar juntamente com vitaminas sintéticas (E e C) e minerais (selénio) em vários países do médio oriente e sudeste da Europa, como é o caso da Turquia, Grécia e Bulgária (Maia *et al.*, 2021). Nestes países coziam as folhas frescas enroladas com um recheio interior feito de arroz e carne picada tornando-se uma possibilidade de consumir estes compostos bioativos na sua alimentação. Descrevem ainda que as pessoas usam também o suco das folhas fervidas a uma temperatura de 120°C a 60 minutos (que é o tempo que consideram adequado para não haver perda das suas propriedades) como antisséptico para colírios (Maia *et al.*, 2021). Nos últimos anos, tem se verificado o reaproveitamento destes compostos numa tendência de praticar uma alimentação mais saudável e rica em antioxidantes e antimicrobianos na possibilidade de promoção de uma boa saúde e bem-estar (Dani *et al.*, 2010; Maia *et al.*, 2021).

Os microrganismos, nomeadamente os fungos e as bactérias, têm um impacto profundo na saúde humana, levando, anualmente, a milhões de infeções e mortes em todo o mundo. Variados estudos têm vindo a ser desenvolvidos no âmbito da descoberta de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos vegetais ou a junção destes com antimicrobianos convencionais, com o objetivo de desenvolver compostos com atividade comparada aos tradicionalmente utilizados e também desenvolver uma técnica de junção destes, isto para reduzir a toxicidade e impacto ambiental e, ainda, aumentar a sua eficácia contra microrganismos resistentes (Moldovan *et al.*, 2020; Schwartz *et al.*, 2020; Simonetti *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2021).

Para a pesquisa que tem por base a sugestão de novos antimicrobianos são consideradas, principalmente, duas abordagens: (i) a busca por novas moléculas com atividade antifúngica e antibacteriana correlacionada com interferência num alvo específico da bactéria ou fungo em estudo, impedindo o seu crescimento (efeito bacteriostático e fungistático, respetivamente) ou provocando a sua morte (efeito bactericida e fungicida, respetivamente); (ii) a procura por moléculas que possam melhorar a atividade de um agente antibacteriano ou antifúngico convencional, usualmente utilizado na terapêutica humana (Cerqueira *et al.*, 2021). Mais recentemente são cada vez mais os grupos de investigação a utilizar a metodologia de “drug repurposing” para identificação de moléculas com atividade antimicrobiana (Jampilek, 2022). O termo “drug repurposing”, em português reaproveitamento de medicamentos, envolve a investigação de medicamentos existentes com o objetivo de apresentação de novos fins terapêuticos para os mesmos que já apresentam informações detalhadas disponíveis, como a sua farmacocinética, farmacodinâmica e toxicidade potencial, na perspetiva de aproveitar fármacos não antimicrobianos como fármacos antimicrobianos, com a intuição de combater multirresistências e levando ao desenvolvimento de opções terapêuticas inovadoras dos fármacos já existentes (Jampilek, 2022). A utilização da metodologia de reaproveitamento de medicamentos para aplicação como fármacos antimicrobianos foi já aplicada aos neurolépticos fenotiazínicos (antipsicóticos) (Amaral *et al.*, 1996) e anestésicos locais (Pospíšilová *et al.*, 2020). Com esta estratégia de reaproveitamento de medicamentos é importante que atividade antimicrobiana seja alcançada numa concentração menor do que o efeito tóxico ou do efeito do fármaco para a indicação terapêutica original (Jampilek, 2022).

Esta dissertação foi baseada na abordagem (i) acima referida, ou seja, descoberta de novas moléculas ou extratos com atividade antimicrobiana. Só foi possível realizar esta abordagem por falta de tempo e de quantidade de amostra para estudo.

Para este trabalho os microorganismos alvo de estudo foram *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Foram escolhidos estes microorganismos pela sua prevalência em termos de doença em humanos e o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos devido a diferentes mecanismos de resistência desenvolvidos pelos microorganismos citados. Foi, por isso, efetuado o estudo de novas substâncias naturais antimicrobianas no âmbito do combate às resistências aos antimicrobianos convencionais e promoção da sustentabilidade dos subprodutos da vinha que possuem, como já referido, bastante interesse a nível da saúde.

Candida albicans é uma levedura e a principal responsável pela maioria das infeções fúngicas, nomeadamente infeções graves como um patógeno oportunista, associadas a elevadas taxas de mortalidade. Os fatores predisponentes descritos são a idade (sendo os idosos e os recém-nascidos mais frequentemente infetados), gravidez, uso frequente de antimicrobianos, terapia com corticoides, tratamento anticancerígeno, doenças do aparelho digestivo, deficiências nutricionais como ferro e ácido fólico, diabetes, hipotireoidismo e infeção pelo Vírus de Imunodeficiência Humana (VIH) (Talapko *et al.*, 2021). Exemplos de infeções oportunistas por *Candida albicans* incluem infeção pulmonar em indivíduos infetados pelo VIH, infeções cutâneas superficiais e profundas atingindo a corrente sanguínea, infeções fúngicas associadas à doença inflamatória intestinal, candidíase oral provocada pela utilização de próteses dentárias e aparelhos ortodônticos (Kaur *et al.*, 2017; Fesharaki *et al.*, 2018; Talapko *et al.*, 2021). A candidíase oportunista é ainda muito comum a nível hospitalar e internamento associada à utilização de cateteres e algalias (Fesharaki *et al.*, 2018). De entre os seus fatores de virulência destacam-se: variabilidade genética, produção de enzimas e biofilmes, dimorfismo e capacidade de adesão, todos eles contribuindo para a sua patogenicidade (Lopes *et al.*, 2022). O mecanismo de ação centra-se: (i) na inibição das enzimas oxidativas associadas ao Citocromo P450, bloqueando a conversão de lanosterol em ergosterol, levando este processo a uma alteração na permeabilidade da membrana das células fúngicas; (ii) produção de uma acumulação de

peróxido de hidrogénio, que leva à danificação da estrutura organolética das células fúngicas (Shafieia *et al.*, 2020). Os mecanismos de resistência incluem: mutações no gene ERG11, que resulta exacerbação da expressão deste; mutações levando à expressão de função no gene UPC2, regulador da via de biossíntese de ergosterol, que por sua vez esta mutação leva ao aumento da expressão de ERG11; mutações nos genes ERG3 ou ERG6, que provocam acumulação de esteróis tóxicos; expressão de bombas de efluxo; alterações enzimáticas envolvidas na via de síntese de esfingolipídios (Lopes *et al.*, 2022). Estes mecanismos conferem a *C. albicans* resistência principalmente aos antifúngicos do grupo dos azóis, sendo estes um grupo de antifúngicos muito utilizados para tratar infeções provocadas por este microrganismo.

Candida krusei, é um saprófita facultativo e uma levedura intrinsecamente resistente ao fluconazol por mutações no gene ERG11, o que diminui as opções terapêuticas para o tratamento de infeções por ela provocadas. Estas tornam-se patogénicas em pacientes com o sistema imunológico comprometido podendo causar doenças em praticamente todos os órgãos e tecidos resultando, podendo assim apresentar-se como uma infeção superficial, invasiva ou sistémica, podendo mesmo ser fatal em indivíduos imunocomprometidos (Gómez-Gaviria *et al.*, 2020; Jamiu *et al.*, 2020). Os fatores de risco para infeção por esta espécie são implantes artificiais, presença de condições oncológicas, uso excessivo e descontrolado de agentes antimicrobianos (como pré exposição a fluconazol, vancomicina e tazobactam). Como fatores de virulência exhibe transição dimórfica devido á natureza invasiva das pseudohifas a temperaturas mais baixas e há formação de biofilmes monoespécies, bem como polimicrobianos com outros fungos e bactérias (Gómez-Gaviria *et al.*, 2020). Estes mesmos fatores de virulência vão lhe permitir para além de invadir o hospedeiro imunocomprometido, criar resistências também ao grupo dos azóis (Jamiu *et al.*, 2020).

Escherichia coli é um bacilo de Gram-negativo e anaeróbio facultativo e que faz parte da microbiota de humanos e outros mamíferos. Causa uma variedade de infeções humanas, incluindo doenças gastrointestinais e infeções extraintestinais (Riley, 2020). É resistente a quase todos os agentes antimicrobianos clinicamente relevantes, por ter grande capacidade de acumular genes de resistência por meio de transferência horizontal de genes (Poirel *et al.*, 2018). Esta bactéria atua como dadora e recetora de genes de resistência, ou

seja, tanto pode adquirir de outras bactérias como transmitir os seus genes a outras bactérias através de plasmídeos, captação de DNA exógeno, bacteriófagos e por pili e fímbrias (Poirel *et al.*, 2018). Os seus principais mecanismos de resistências incluem: a aquisição de genes que codificam para β -lactamases de amplo espectro e carbapenemases; genes 16S rRNA metilases conferindo resistências a aminoglicosídeos; genes de resistência a quinolonas mediadas por plasmídeos (fluoroquinolonas) (Poirel *et al.*, 2018).

Staphylococcus aureus é um coco de Gram-positivo e uma das causas mundiais mais frequentes de mortalidade devido à ampla variedade de doenças, variando de infeções de pele, a pneumonia fatal e a sepsis (Cheung *et al.*, 2021). Colonizam a pele ou mucosas causando doenças principalmente em pessoas com condições médicas subjacentes ou que passaram por procedimentos médicos, como por exemplo intubação ou utilização de cateteres. É encontrada na microbiota comensal da mucosa nasal, em cerca 20 a 40% da população geral (Lee *et al.*, 2018). As infeções causadas por esta bactéria são particularmente problemáticas devido à resistência a vários antibióticos (Cheung *et al.*, 2021). As infeções mais problemáticas são provocadas por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) que são acompanhadas de mortalidade e intervenção hospitalar na sua maioria, é muito endémico na maioria dos estabelecimentos de saúde (Lee *et al.*, 2018). *S. aureus* resistente à meticilina foi descrito pela primeira vez na Inglaterra em 1961, logo após a introdução da meticilina na prática clínica (Lee *et al.*, 2018). MRSA resulta da captação por transferência horizontal de genes do cromossoma *mec* da cassette *Staphylococcus (SCCmec)*, que codifica os genes *mecA* ou *mecC* que por sua vez codificam proteínas que tornam a bactéria resistente a todos os β -lactâmicos (incluindo meticilina), com exceção da ceftarolina que tem capacidade de combater esta resistência (Lee *et al.*, 2018).

Neste trabalho foi desenvolvido o estudo da atividade antimicrobiana dos extratos aquosos, etanólicos e hidroalcoólicos de duas Castas nacionais: Casta de Viosinho e Casta de Roriz, contra duas espécies de leveduras, *Candida albicans* e *Candida krusei* e duas espécies de bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Para este estudo foi feita avaliação da atividade antifúngica pelo método de difusão em agar por poço e também avaliação da atividade antifúngica e antibacteriana pelo método de microdiluição em caldo.

1.2. Motivação

Para a elaboração deste trabalho, iniciou-se uma pesquisa bibliográfica atual, incluindo-se os subprodutos vitivinícolas como principais elementos-chave para a pesquisa. Verificou-se que a utilização de recursos subaproveitados deste setor tem merecido muito interesse pela comunidade científica e pelas indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética. Atendendo a este mercado emergente, uma das motivações prende-se com a sustentabilidade, a qual integra uma abordagem transversal e global, onde se avalia o impacto de três fatores essenciais, capazes de, em conjunto, contribuir para os objetivos de continuidade e equilíbrio no uso e gestão dos recursos subvalorizados ou desperdiçados.

O presente trabalho visa realizar um estudo preparatório no sentido de valorizar os resíduos vitivinícolas de duas castas nacionais.

1.3. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi, fundamentalmente, potenciar o processo de extração dos compostos bioativos presentes nos engaços provenientes das castas de Viosinho e Roriz. Foram quantificados os teores de compostos bioativos (fenólicos e flavonóides) bem como a atividade antioxidante dos diferentes extratos. Por último testar a capacidade antimicrobiana dos extratos em duas leveduras, *Candida albicans* e *Candida krusei*, e duas bactérias, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, no sentido de superar efeitos colaterais dos antibióticos convencionais.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostras dos Engaços

Os Engaços das Castas Viosinho e Roriz foram recolhidos em outubro de 2021, nos lagares da Sociedade Agrícola Trigo de Negreiros L^{da}., localizada em Bragança, Portugal. Após a colheita de uma amostra significativa (~10Kg), os mesmos foram secos à temperatura ambiente, isentos de humidade e protegidos de luz, durante uma semana. Após secagem, efetuou-se a medição do teor de humidade na balança eletrónica de humidades, de forma a garantir humidade inferior a 10%, considerando uma planta seca isenta de humidade. Confirmada a desidratação (<10% humidade) foi efetuada a trituração total dos engaços recorrendo a um moinho (GM Grindomix, Retsh Alemanha) durante 120 segundos a 5000rpm para obtenção de um pó fino, o qual foi armazenado em frascos de vidro hermeticamente fechados e resguardados da luz.

2.2. Reagentes e Padrões

Os reagentes utilizados na obtenção dos extratos foram: etanol absoluto adquirido na Fisher Chemical. (Loughborough, Inglaterra) e água desionizada. Na avaliação dos fenólicos totais foram utilizados: carbonato de sódio (Na_2CO_3) e ácido gálico ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$) adquiridos na Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA); e, o reagente de Folin-Ciocalteu adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). Na avaliação dos flavonóides totais foram utilizados: catequina ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$) e nitrito de sódio (NaNO_2) adquiridos na Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA); cloreto de alumínio (AlCl_3) adquirido na Panreac (Barcelona, Espanha); hidróxido de sódio (NaOH) adquirido da VWR International (Leuven, Bélgica). Na avaliação da atividade antioxidante foram utilizados: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), solução tripiridiltriazina (TPTZ), acetato de sódio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$), ácido acético glacial (CH_3COOH), cloreto férrico (FeCl_3) e sulfato ferroso (FeSO_4) adquiridos na Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA). Na sua integridade os reagentes utilizados neste trabalho apresentam grau analítico.

O reagente utilizado na determinação da atividade antifúngica em agar por poço foi: placas de Sabouraud dextrose agar (SDA) adquiridas na Biomerieux (Marcy-l'Étoile,

França). Na determinação da atividade antifúngica por microdiluição foi utilizado: meio Sabouraud dextrose broth (SDB) adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Na determinação da atividade antibacteriana por microdiluição foi utilizado: meio Mueller-Hinton II (MH II) adquirido na Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Na preparação da suspensão de leveduras e bactérias foi utilizado soro fisiológico, preparado com cloreto de sódio (NaCl) adquirido na Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

2.3. Preparação dos Extratos dos Engaços

Foram adicionados 6,5 mg de amostra de engaço de cada casta pulverizada com 100 mL de solvente. No sentido de otimizar o poder extrator do solvente, foram realizados 3 extratos utilizando diferentes solventes obtendo-se o seguinte perfil: 100% aquoso; 100% etanólico e 50/50 (v/v) hidroalcoólico. As extrações sólido/líquido foram efetuadas durante 1h, a 45°C, numa placa de aquecimento sob agitação constante (600rpm). Posteriormente foi efetuada a filtração de todos os extratos recorrendo a papel de filtro Whatman nº1, recolhendo 10 mL de cada extrato para armazenamento a -20°C.

Os diferentes extratos foram usados para avaliação dos compostos fenólicos totais, flavonóides totais e atividade antioxidante através de dois métodos colorimétricos: Capacidade antioxidante por captação de radicais – Composto orgânico 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e de Transferência de eletrões - Ensaio de poder antioxidante de redução férrica (FRAP).

2.4. Determinação dos Compostos Fenólicos Totais

A determinação dos compostos fenólicos totais foi fundamentada na metodologia espectrofotométrica descrita por Costa et al. (2018), recorrendo-se ao reagente de Folin-Ciocalteu. Foram adicionados a cada 30µL de cada extrato, 150µL de reagente Folin-Ciocalteu, previamente diluído (1:10 v/v), e 120µL de Na₂CO₃ a 7.5%. Após homogeneização da mistura, a solução obtida foi incubada a 45°C diretamente no leitor de microplacas

Synergy HT (BioTek Instruments, Synergy HT GENS5, EUA – Espectrofotômetro de microplacas com 96 poços), ao abrigo da luz durante 15 minutos, procedendo-se à leitura das absorvâncias a 765nm. Para esta determinação foi usado como padrão o ácido gálico. A curva de calibração foi obtida através da correlação entre absorvência das amostras e a concentração do padrão ($y = 0,0082x + 0,0049$; $r^2 = 0,9991$). Os resultados obtidos foram expressos em miligramas de equivalentes em ácido gálico por 100 gramas de extrato seco (mg EAG/ 100g de extrato seco) (Costa *et al.*, 2018). Todas as determinações analíticas foram realizadas em triplicado.

2.5. Determinação dos Flavonóides Totais

Para esta determinação foi utilizado um ensaio colorimétrico baseado na formação de complexos flavonóide-alumínio a 510nm. A cada 30 μ L de cada extrato foram adicionados 75 μ L de água destilada e 45 μ L de NaNO₂ a 1%. Após 5 minutos de reação, adicionaram-se 45 μ L de uma solução de AlCl₃ a 5%. No final, foram adicionados 60 μ L de NaOH (1M) e 45 μ L de água destilada (Costa *et al.*, 2018). A leitura das absorvências foi efetuada num leitor de microplacas, utilizando-se como padrão a catequina. A curva de calibração foi obtida através da correlação entre absorvência das amostras e as diferentes concentrações de catequina ($y = 0,0024x + 0,0059$; $r^2 = 0,9994$). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de catequina por 100 gramas de extrato seco (mg EC/ 100g de extrato seco). Todas as determinações analíticas foram realizadas em triplicado.

2.6. Determinação da Atividade Antioxidante

2.6.1. Método DPPH

O método DPPH foi desenvolvido por Blois em 1958. Este método consiste que após a reação do radical da molécula com a substância antioxidante, passando de cor violeta escuro para amarelo ou violeta claro. Em sequência, a mistura apresenta diminuição da

absorvância que esta pode ser medida por um espectrofotômetro UV/visível para determinação da capacidade antioxidante da substância em estudo. Neste método, normalmente para realização da curva de calibração e como padrão é utilizado o Trolox, que é uma substância derivada da vitamina E, solúvel em água e etanol, sendo uma substância capaz de reagir com a molécula de DPPH devido ao seu potencial antioxidante (Silveira *et al.*, 2018).

Os diferentes extratos em estudo foram analisados segundo o método descrito por Costa *et al.* (2014), com ligeiras alterações. Para o desenvolvimento da técnica, foram utilizados 30µL de padrão Trolox/branco/extrato diluído (1:10) misturados com 270µL da solução de DPPH. A diminuição do DPPH foi medida num leitor de microplacas (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA), em intervalos de tempo iguais (10 minutos) monitorizado a diminuição da absorção 515nm, de forma a obter uma cinética de reação. O ponto final da reação foi atingido em 20 minutos. A curva de calibração foi preparada com Trolox ($y = 0,0067x + 0,5496$; $r^2 = 0,9972$) e a atividade de eliminação do radical DPPH foi expressa em µmol de equivalentes Trolox (TE)/ 100g de amostra seca (Costa *et al.*, 2014a). Todas as determinações analíticas foram realizadas em triplicado.

2.6.2. Método FRAP

O método FRAP permite observar e quantificar a mobilidade das proteínas dentro de uma célula viva, medindo assim a capacidade antioxidante de uma molécula. Este método foi desenvolvido por Axelrod em 1970. O que ocorre neste método é que o complexo férrico-tripiridiltriazina (FeIII-TPZ) é reduzido ao complexo ferroso (FeII-TPZ), na presença de um antioxidante e em condições ácidas. O complexo formado por esta reação apresenta uma coloração azul intensa, com absorção máxima a 593nm (Sucupiraa *et al.*, 2012).

O método FRAP dos diferentes extratos em estudo foi realizado segundo o método descrito por Costa *et al.* (2014), com ligeiras alterações. Para o desenvolvimento da técnica, foram utilizados 35µL de padrão de sulfato ferroso (5 - 600µM) /branco/extratos diluídos (1:10) foram misturados com 265µL do reagente FRAP (tampão acetato 0,3M, solução TPTZ 10mM e cloreto férrico 20mM). A mistura foi mantida por 30 minutos a 37°C ao

abrigo da luz e, em seguida, as absorvâncias foram efetuadas a 595nm usando um leitor de microplacas (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA). A curva de calibração foi preparada com sulfato ferroso ($y = 0,002x + 0,0022$; $r^2 = 0,9998$) e o poder antioxidante foi expresso equivalentes de μmol de sulfato ferroso equivalentes (FSE)/ 100g de amostra seca (Costa *et al.*, 2014a). Todas as determinações analíticas foram realizadas em triplicado.

2.7. Microrganismos

Foram selecionadas para estudo as leveduras *Candida albicans* ATCC10231 e *Candida krusei* ATCC6258. No que se refere às bactérias selecionou-se *Staphylococcus aureus* ATCC29213 como representante de bactérias Gram-positivo e *Escherichia coli* ATCC25922 como representante de bactérias Gram-negativo, como já referido anteriormente.

As metodologias utilizadas no estudo da atividade antimicrobiana, seguiram as determinações (CLSI, 2009) e procedimentos descritos em artigos com foco em extratos vegetais (Bona *et al.*, 2014; Va'zquez-Armenta *et al.*, 2017; Radojević *et al.*, 2022), com as adaptações necessárias.

2.8. Avaliação da Atividade Antifúngica pelo Método de Difusão em Agar por Poço

O Método de Difusão em Agar por poço foi realizado em Placas de SDA (Sabouraud dextrose agar) com extratos das respectivas castas em estudo, impregnados em cavidades feitas nas placas para ser obtida informação da inibição que provocam perante as leveduras aqui abordadas. É uma técnica de perfuração do agar e que é influenciada pela velocidade de crescimento do microorganismos. Fundamenta-se na difusão do extrato a ser estudado com posterior medida e visualização dos halos de inibição.

Para esta técnica foram testados os extratos etanólicos, hidroalcoólicos e aquosos dos engaços com suspensão de leveduras *C. albicans* e *C. krusei* nas placas de SDA com a

densidade ótica de 0,5 McFarland em soro fisiológico. Foram colocados 100µL da suspensão de levedura na placa com ajuda de uma pipeta automática e de seguida foi espalhada com ajuda de um espalhador. Foi deixada a secar á temperatura ambiente durante 10 min. De seguida, para remoção do meio de cultura sólido, foram cortados poços com diâmetro de 6mm, utilizando-se para o efeito a parte superior de uma pipeta Pasteur de vidro, previamente esterilizada. Foram posteriormente depositados, em cada poço, 50µL dos extratos e de cada um dos solventes, com ajuda de uma pipeta automática, servindo como controlos da atividade antifúngica os próprios solventes. Todo o procedimento foi realizado por técnica assética. Por fim, foram incubadas as placas na estufa a 35°C durante 24 horas. De seguida, procedeu-se á medição dos halos de inibição dados pelos extratos com ajuda de uma craveira obtendo assim os resultados em milímetros (mm).

2.9. Método de Microdiluição em Caldo

Quanto ao Método de Microdiluição em caldo envolve o uso de pequenos volumes e permite estimar quantitativamente a atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias. O procedimento foi realizado numa placa estéril de 96 poços em que são colocados os microrganismos em contacto com os extratos em estudo (M27-A2, 2002; M7-A6, 2003).

Nesta técnica, foram utilizados extratos secos, depois de dissolvidos em Dimetilsulfóxido (DMSO). Foram preparados novos extratos aquosos, etanólicos e hidroalcoólicos, que foram secos em exsiccador. Após os extratos estarem completamente secos, foram dissolvidos em DMSO por forma a obter uma concentração de 10mg de extrato seco por mL de DMSO.

2.9.1. Avaliação da Atividade Antifúngica

Para Avaliação da Atividade Antifúngica foi utilizado SDB (Sabouraud dextrose broth), tem na sua constituição elevada concentração de dextrose, o que proporciona uma seletividade para o desenvolvimento de fungos pelo que a maioria das bactérias não tolera a

elevada concentração de dextrose. Ainda contém um pH ácido entre 5,4 a 5,8, o que permite melhorar o crescimento destes, e também, as pectonas existentes neste meio são fontes de compostos nitrogenados o que se torna excelente e atrativo para o desenvolvimento de fungos (Laborclin, 2019). Esta avaliação foi baseada na técnica CLSI (M27-A2, 2002).

Foi preparada a suspensão de leveduras com densidade ótica de 0,5 McFarland em soro fisiológico. Depois foram colocados 20 μ L da suspensão e 980 μ L de meio (diluição 1:50) e foram colocados 0,5mL desta última preparação e 9,5mL de meio (diluição 1:20). Esta última suspensão foi utilizada como suspensão de trabalho.

Para realização deste método foram colocados 100 μ L de meio SDB nos poços de B a G de uma placa de 96 poços de fundo plano e 192 μ L de meio SDB nos poços de A1 a A12. Nestes poços da linha 1, foram colocados somente 8 μ L de cada extrato em estudo. Dos poços B a G foram efetuadas diluições de 1:2 com a ajuda de uma pipeta multicanal e rejeitados 100 μ L no poço G. De seguida, foram adicionados 100 μ L da suspensão de leveduras, preparada previamente, nos poços com extrato e no controlo positivo. Quanto ao controlo negativo foram adicionados 200 μ L de meio SDB, para verificação de possível contaminação do meio. Todo este procedimento foi efetuado por técnica assética. Por último, foi incubado durante um período de 48h a uma temperatura de 35°C para que se pudesse verificar presença ou ausência de crescimento. Esta avaliação do crescimento microbiano foi realizada visualmente, sendo definida como Concentração Mínima Inibitória (CMI) a que apresentava total ausência de crescimento (*optical clear*, como definido pela norma (M27-A2, 2002)).

2.9.2. Avaliação da Atividade Antibacteriana

Para a Avaliação da Atividade Antibacteriana foi usado o meio de Mueller-Hinton II (MH II) por ser considerado um excelente meio para testes de sensibilidade contra bactérias não fastidiosas, e corresponder ao definido na norma de referência adotada para este trabalho (M7-A6, 2003). Isto é provado pelas seguintes razões: apresenta reprodutibilidade aceitável; contém baixos teores de inibidores de sulfonamida, trimetoprim e tetraciclina;

produz um crescimento considerável na maior parte das bactérias; deverá ter um pH entre 7,2 a 7,4 para ser mais favorável o crescimento. Esta avaliação foi baseada na norma CLSI (M7-A6, 2003).

Para realização da técnica foram colocados 100 μ L de meio MH II do poço B a G de uma placa de 96 poços de fundo plano e 192 μ L de meio MH II do poço A1 a A12. Nos poços desta linha foram, como anteriormente, colocados somente 8 μ L de cada extrato. Foram efetuadas diluições de 1:2 até à linha G onde foram rejeitados 100 μ L da suspensão. Foi adicionado nos poços do controlo positivo 100 μ L de meio MH II e nos poços do controlo negativo foram adicionados 200 μ L de meio. Este procedimento foi realizado por técnica assética. Por último, foi incubado 24h a 35°C e observação quanto á presença ou ausência de crescimento. A suspensão de bactérias foi preparada da mesma forma que a suspensão de leveduras, consoante indicações da seguinte norma CLSI (M7-A6, 2003). Por fim, foi adicionado 100 μ L desta suspensão nos poços com extrato e no controlo positivo. Esta avaliação do crescimento microbiano foi realizada visualmente, como foi referido no ponto de avaliação antifúngica pelo mesmo método, sendo definida como Concentração Minimia Inibitória (CMI) a que total ausência de crescimento (*optical clear*, como definido pela norma (M7-A6, 2003)).

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Teores de Fenólicos Totais (FT) e Flavonóides Totais (FLT)

Tendo em consideração a caracterização química e a polaridade dos diferentes compostos bioativos presentes nos engaços das amostras estudadas, realizaram-se 3 extratos diferentes (aquoso, etanólico e hidroalcoólico) para a quantificação dos compostos bioativos (**Tabela 1**).

Tabela 1. Teor de compostos bioativos presentes nos extratos aquosos, etanólicos e hidroalcoólicos das Castas de Viosinho e Roriz. Os teores de fenólicos totais (FT) e de flavonóides totais (FLT) estão expressos em mg/100g de extrato seco.

Amostras	FT	FLT
EV (aquoso)	3817,45 ± 184,15	1360,96 ± 105,59
EV (etanólico)	5865,47 ± 598,40	2460,01 ± 368,66
EV (hidroalcoólico)	3954,61 ± 392,41	361,30 ± 59,16
ER (aquoso)	4873,21 ± 319,20	1519,59 ± 92,30
ER (etanólico)	6892,27 ± 458,62	2776,72 ± 192,84
ER (hidroalcoólico)	15292,27 ± 543,03	232,65 ± 10,56

*EV (Extrato da Casta Viosinho) / ER (Extrato da Casta Roriz). Valores apresentados em Média ± Desvio Padrão

A escolha do solvente extrator, como já foi referido, influencia tanto o processo de extração dos engaços como a determinação dos compostos fenólicos (Va'zquez-Armenta *et al.*, 2017). Em vários estudos foi utilizado o metanol como solvente extrator, este é um solvente tóxico que provoca acidose e danos na retina (Joshi *et al.*, 2019), por este mesmo motivo optamos por utilizar solventes não tóxicos, que podem não expressar tanta eficácia no processo de extração como na determinação de compostos fenólicos, que por sua vez a escolha do solvente influencia os resultados obtidos, como foi o caso deste trabalho e já

reportado em vários estudos (Baiano, 2014; Barros *et al.*, 2014; Leala *et al.*, 2020). Este facto é verificado nos extratos estudados e expressos na Tabela 1. Em ambos os engaços, o etanol foi o melhor solvente extrator, seguindo-se o hidroalcoólico e aquoso, respetivamente. No que toca ao maior teor de fenólicos totais nos extratos etanólicos, o engaçororiz foi o que apresentou maior quantidade (6892,27mg EC/ 100g). O etanol mostrou-se o melhor extrator dos FLT em ambas as amostras. Quando comparados os teores de flavonoides no mesmo extrato (etanólico), verifica-se que o engaçororiz apresenta os teores mais elevados. As diferenças quantitativas encontradas na composição fenólica dos dois engaços, independentemente do solvente extrator, provam que existem composições químicas para cada variedade de casta. Esta diferença quantitativa também pode dever-se às diferentes condições climáticas e edáficas, bem como pelas práticas vitivinícolas (Barros *et al.*, 2014; Va'zquez-Armenta *et al.*, 2017; Leal *et al.*, 2020).

Segundo vários autores, a Casta Roriz origina vinho tinto, o que permite apresentar maiores teores de flavonóides e compostos fenólicos, (Georgiev *et al.*, 2014; Lia *et al.*, 2019; Radojević *et al.*, 2022). Segundo Sousa *et al.* (2017) a quantidade de polifenóis nas castas de vinho tinto é seis vezes superior às castas de vinho branco.

Os compostos fenólicos são antioxidantes não enzimáticos que incluem a capacidade de eliminação de radicais livres e a inibição da formação de espécies reativas durante o processo normal do metabolismo, prevenindo assim o envelhecimento celular (Lia *et al.*, 2019). Os resultados obtidos foram expressos em ácido gálgico por ser um composto fenólico importante ao nível da saúde, porque este já demonstrou possuir várias propriedades terapêuticas, como antioxidante, antiinflamatória, antifúngica e antibacteriana. Os flavonoides são fitonutrientes biologicamente ativos, encontrados na uva, que possuem propriedades cardioprotetoras, neuroprotetoras, antimicrobianas e antienvhecimento (Georgiev *et al.*, 2014; Radojević *et al.*, 2022).

Concluindo, as castas de uva tinta têm maior abundância destes compostos comparativamente às castas de uva branca. Por este motivo, estas castas de uva tinta como é o caso da Casta de Roriz, presente neste estudo, devem ser utilizadas ao nível da indústria far-

macêutica na perspectiva de desenvolver novos compostos a partir deste produto reaproveitando componentes das castas que são desperdiçados da vinha (Sousa *et al.*, 2017; Vinha *et al.*, 2022).

3.2. Atividade Antioxidante pelos métodos FRAP e DPPH

A análise da capacidade antioxidante dos diferentes extratos constitui uma ferramenta de correlação com o teor de fenólicos e flavonóides totais e, ainda, permite a avaliação da capacidade específica de eliminação de radicais atribuível aos extratos em estudo. Os resultados foram expressos pela realização de dois métodos: FRAP, que deteta a presença de antioxidante pela redução do ferro, e DPPH que consiste na reação do radical da molécula com a substância antioxidante, nos extratos de Casta de Viosinho e Roriz recorrendo a três solventes (**Tabela 2**).

Tabela 2. Atividade antioxidante presente nos extratos de engajo das Castas de Viosinho e Roriz pelos métodos FRAP e DPPH estão expressos em $\mu\text{mol}/100\text{g}$ de amostra seca.

Amostras	FRAP	DPPH
EV (aquoso)	3817,45 \pm 184,15	43637,11 \pm 484,71
EV (etanólico)	5865,47 \pm 598,40	66871,02 \pm 173,20
EV (hidroalcoólico)	3954,61 \pm 392,41	9379,74 \pm 150,08
ER (aquoso)	4873,21 \pm 319,20	54544,33 \pm 4495,97
ER (etanólico)	6892,27 \pm 458,62	71024,53 \pm 2752,34
ER (hidroalcoólico)	15292,27 \pm 543,03	8662,04 \pm 853,71

*EV (Extrato da Casta Viosinho) / ER (Extrato da Casta Roriz). Valores apresentados em Média \pm Desvio Padrão

Quanto à atividade antioxidante, uma vez mais, o extrato etanólico viosinho apresentou maior potencial antioxidante em ambos os métodos analíticos (FRAP – 5865,47 μ mol/100 g de amostra seca e DPPH – 66871,02 μ mol/100g de amostra seca). A casta roriz apresentou uma variação da atividade antioxidante em diferentes solventes. A mistura hidroalcoólica obteve maior atividade no método FRAP, enquanto o extrato etanólico foi superior no método DPPH. Através da análise global dos resultados (**Tabela 1 e 2**) a Casta de Roriz (uva tinta) apresenta superioridade de fenólicos e flavonoides contribuindo para uma atividade antioxidante superior (Barros *et al.*, 2014; Radojević *et al.*, 2022).

Importa realçar que este trabalho ainda é um projeto preliminar, pois mais determinações analíticas deveriam ser efetuadas. Por exemplo, o perfil fenólico é uma das propostas futuras, tendo em consideração que a distribuição dos metabolitos secundários nos diferentes órgãos vegetais de uma espécie botânica é muito heterogênea. No que toca à determinação da atividade antioxidante, é de conhecimento geral que não existe um método analítico específico tendo em consideração a complexidade química das matrizes vegetais, para tal então foram utilizadas as duas técnicas referidas. O método de DPPH é considerado por estudos anteriores (David *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2021; Radojević *et al.*, 2022) dos mais precisos e reprodutivos na avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais, ou seja, substâncias ricas em flavonóides, também é considerado fácil, preciso, rápido, simples, económico e apresenta boa estabilidade na ausência da luz (Silveira *et al.*, 2018). O método FRAP é uma técnica reprodutível e apresenta uma superior correlação com os teores de ácido ascórbico e grupos fenólicos (Sucupiraa *et al.*, 2012). Mais ensaios deveriam ser efetuados no futuro para conclusões mais objetivas e concretas.

Na verdade, os compostos antioxidantes têm a capacidade de neutralizar o stress oxidativo de várias maneiras, sendo estas a inibição da formação de radicais livres, funcionando como antioxidantes de quebra de cadeia de autoxidação, regulam e protegem os mecanismos celulares de defesa antioxidante, são neutralizadores da ação dos quelantes de metais e inibidores de enzimas (Georgiev *et al.*, 2014). Os flavonóides representam um grande grupo de compostos de baixo peso molecular com altas propriedades antioxidantes o que lhe é permitido de reduzir o stress oxidativo por diversos mecanismos. Por este motivo e em conclusão com os resultados obtidos, os subprodutos da Casta de Roriz poderão ser utilizados como um composto biologicamente ativo combatendo o stress oxidativo nas

células, prevenindo danos oxidativos e ainda tem a função de sequestrar radicais livres e quelantes de metais (Georgiev *et al.*, 2014).

A quantidade de compostos fenólicos presentes nas plantas, nomeadamente nas videiras e nos seus subprodutos, como o engaço, e conseqüentemente a sua atividade antioxidante, pode ser influenciada pelo local geográfico em que se desenvolve, como foi referido no contexto teórico. No caso da vinha, Gouvinhas e os seus colaboradores (Gouvinhas *et al.*, 2020), demonstraram o impacto da região geográfica na atividade antioxidante, ao concluírem que as amostras de engaço revelaram maiores teores de fenóis e flavonóis totais em locais de menor altitude, como é o caso da sub-região do Baixo Corgo (Alto Douro). Esta sub-região caracteriza-se por apresentar alguns fatores de stress, como stress térmico e hídrico (chuvas abundantes). Por este motivo pode ser explicada esta situação da indução da produção destes compostos bioativos (Gouvinhas *et al.*, 2020).

3.3. Atividade Antifúngica pelo Método de Difusão em Agar por Poço

Está descrito que os extratos de videira para além da atividade antioxidante expressam atividade antifúngica e antibacteriana, isto torna-se uma alternativa de reaproveitamento de subprodutos da vinha para criação de novos produtos com propriedades antimicrobianas (Leal *et al.*, 2020). Por isso procedeu-se á determinação da atividade antifúngica dos extratos preparados pelo método de difusão em agar por poço, obtendo-se os resultados expressos na **Tabela 3**. Foram apenas apresentados os resultados obtidos quando se testaram extratos etanólicos porque com os outros solventes não ocorreram halos de inibição visíveis nem possíveis de quantificar.

Tabela 3. Média da medida dos halo de inibição dado pelos Extratos Etanólicos da Casta de Viosinho e Roriz

<i>C. albicans</i> (medição em cm)	<i>C. krusei</i> (medição em cm)
Extrato Etanólico de Viosinho	Extrato Etanólico de Viosinho
1,00 ± 0,00	1,10 ± 0,36

Importância das Castas Viosinho e Roriz como possíveis fontes de compostos Antioxidantes e Antimicrobianos

<i>C. albicans</i> (medição em cm)	<i>C. krusei</i> (medição em cm)
Extrato Etanólico de Roriz	Extrato Etanólico de Roriz
0,90 ± 0,10	1,25 ± 0,50
Controlo Etanólico <i>C. albicans</i>	Controlo Etanólico <i>C. krusei</i>
1,80 ± 0,72	1,05 ± 0,06

*Valores apresentados em Média ± Desvio Padrão



Figura 2. Placa com *C. albicans* exposta segundo a técnica aos Extratos Etanólicos das Castas de Viosinho e Roriz



Figura 3. Placa com *C. krusei* exposta segundo a técnica aos Extratos Etanólicos das Castas de Viosinho e Roriz

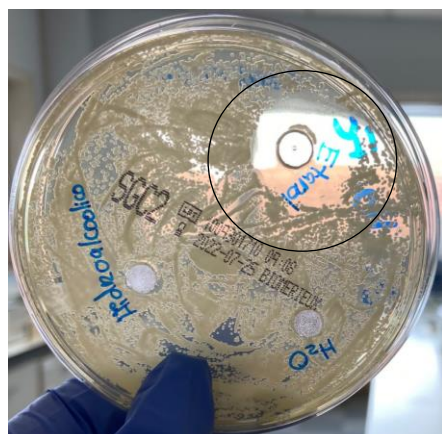


Figura 4. Placa representando as inibições obtidas para solventes extratores (controlo de atividade do solvente) em *C. albicans*



Figura 5. Placa representando as inibições obtidas para solventes extratores (controlo de atividade do solvente) em *C. krusei*

Com base nos resultados alcançados verificou-se que em todas as placas das duas leveduras em estudo os únicos compostos em que é visível alguma inibição de crescimento e até possível de medição do halo de inibição é com o extrato etanólico da Casta de Viosinho e o extrato etanólico da Casta de Roriz. Como próprio nome indica, os engaços da Casta de Viosinho e da Casta de Roriz foram diluídos numa grande quantidade de solvente, 100mL de etanol, tendo-se concluído que o efeito de inibição é devido maioritari-

amente às propriedades do Etanol, por este possuir propriedades antissépticas e desinfetantes representando um papel importante na prática de controlo e prevenção de infeções. Este solvente procede por meio do rompimento de membranas, com rápida desnaturação de proteínas e consequente lise celular. Por isso, o aparecimento destes halos de inibição de cada extrato perante cada levedura pode se dever às propriedades do etanol estando estes engaos bastante diluídos. Por todos os motivos apresentados, e com o objetivo de se efetuar uma discussão coesa dos resultados e poder concluir-se acerca das razões que levaram à inibição e à demonstração de atividade antifúngica que estes extratos possam possuir, terá de ser realizada uma pesquisa posterior. Foi por isso seguidamente realizada a testagem de várias diluições menores de etanol ou de outro solvente que não influencie os resultados nem possua toxicidade, para que se obtenham dados mais concretos relativamente às propriedades de cada casta e não essa ação ser devida a um solvente. Foi concluída esta hipótese porque na placa do controlo do solvente etanol houve um halo de inibição acentuado.

Todas as diferenças observadas nestes resultados indicam que é necessária uma abordagem que inclua um método de execução cuidadoso e preciso, mas acima de tudo o que influencia os resultados é a escolha do solvente e o método de extração. Por este mesmo motivo, a conclusão destes resultados é que o método utilizado não foi o mais eficaz levando a que não haja demonstração da eficácia destes extratos como antifúngicos neste projeto, mas está comprovado por estudo anteriores que estes extratos de videira são eficazes como antifúngicos (Schnee *et al.*, 2013; Prusova *et al.*, 2020; Simonetti *et al.*, 2020; Radojević *et al.*, 2022). Porém, nos estudos referidos, foram utilizados outros solventes extratores (metanol e acetato de etilo) tendo sido esse, provavelmente, o motivo por que terão expressado maior atividade antifúngica.

3.4. Atividade Antifúngica e Antibacteriana pelo Método de Microdiluição em Caldo

Com os extratos aquosos, etanólicos e hidroalcoólicos das duas castas em estudo efetuou-se a avaliação da atividade antifúngica dos extratos secos dissolvidos em DMSO pelo método de microdiluição em caldo contra *Candida albicans* e *Candida krusei*. Os resultados, expressos em concentração mínima inibitória, estão apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Concentração Mínima Inibitória (CMI) em $\mu\text{g/mL}$ da atividade antifúngica

CIM ($\mu\text{g/mL}$)		<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>
Extrato da Casta de Viosinho	Aquoso	>200	>200
	Etanólico	>200	>200
	Hidroalcoólico	>200	>200
Extrato da Casta de Roriz	Aquoso	>200	>200
	Etanólico	>200	>200
	Hidroalcoólico	>200	>200

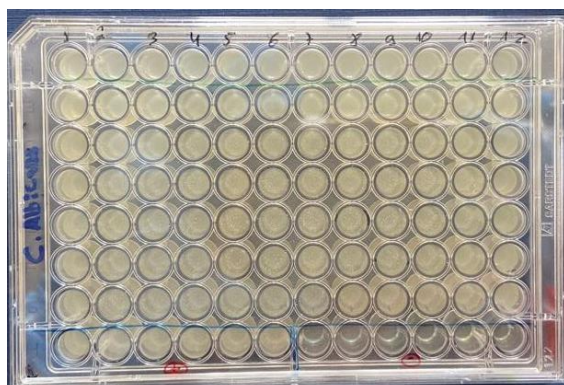


Figura 6. Placa de *C. albicans*

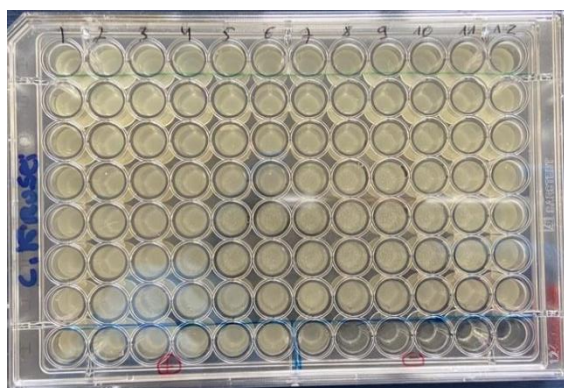


Figura 7. Placa de *C. krusei*

Importância das Castas Viosinho e Roriz como possíveis fontes de compostos Antioxidantes e Antimicrobianos

A atividade antibacteriana dos extratos aquosos, etanólicos e hidroalcoólicos secos e dissolvidos posteriormente em DMSO das duas castas contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* também foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo avaliando a concentração mínima inibitória, sendo os resultados apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Concentração Mínima Inibitória (CMI) em µg/mL da atividade antibacteriana

CIM (µg/mL)		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Extrato da Casta de Viosinho	Aquoso	>200	>200
	Etanólico	>200	>200
	Hidroalcoólico	>200	>200
Extrato da Casta de Roriz	Aquoso	>200	>200
	Etanólico	>200	>200
	Hidroalcoólico	>200	>200

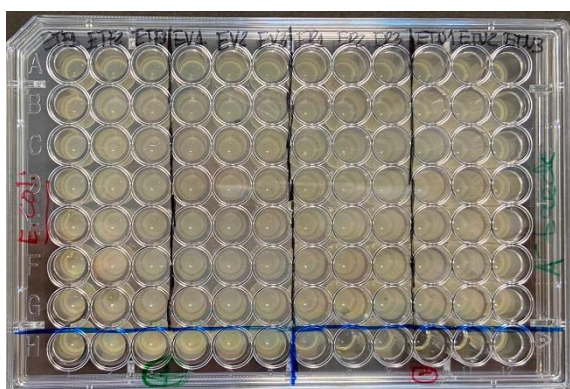


Figura 8. Placa de *E. coli*

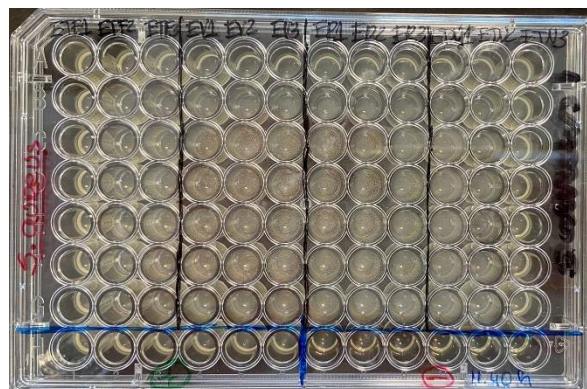


Figura 9. Placa de *S. aureus*

O método de Microdiluição em Caldo, envolve o uso de pequenos volumes, é o mais adequado para determinação CMI, uma vez que é possível estimar quantitativamente a atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias tornando-se assim mais vantajoso isto porque é mais específico e com resultados reprodutíveis, sendo ainda possível efetuar várias repetições e diferentes diluições uniformes dos extratos em apenas numa placa por microorganismo, aumentando assim a confiabilidade dos ensaios (Bona *et al.*, 2014).

Relativamente á discussão dos resultados da testagem desta técnica nestes extratos não ocorreu o esperado, ou seja, os extratos não mostraram a eficácia antimicrobiana perante estes microrganismos em estudo, que normalmente os extratos contendo polifenóis expressam. Podem ser propostos vários fatores para este acontecimento, tais como o microrganismo e a espécie utilizada nos ensaios de atividade antimicrobiana, a origem geográfica dos extratos, a época de colheita, se os extratos foram preparados a partir da planta fresca ou seca, os solventes utilizados na extração e a quantidade de extrato testada. Todos estes fatores vão influenciar a determinação da CMI (Radojević *et al.*, 2022).

Sucintamente e provavelmente, o que influenciou foi a quantidade de extrato a ser testada. A concentração máxima testada pode não ter sido suficiente para inibir completamente o crescimento destes microrganismos. O ideal seria termos possibilidade de obter mais extratos a partir de engajo, fazer novos extratos obtendo maiores massas de extrato seco, e

voltar a testar os extratos em maiores concentrações pela mesma técnica. A quantidade máxima de extrato vai permitir verificar a sua eficácia antimicrobiana, que é esperada destes extratos por terem grande quantidade de polifenóis principalmente a quantidade de resveratrol que permite criar um mecanismo de defesa contra microrganismos e/ou a possibilidade que seria mais rentável a nível de estudo seria extrair os vários polifenóis ficando estes isolados do extrato original para verificar a sua efetividade como antimicrobianos (Castilho *et al.*, 2014).

Com base em vários estudos anteriores, os engaços de videira apresentam atividade antimicrobiana confirmada, mas dada a complexidade da matriz existem vários fatores que influenciam a expressão desta atividade por este motivo precisamos de mais estudos nesta abordagem de novos antimicrobianos provenientes de extratos vegetais.

O estudo de *Radojević et al.*, teve como objetivo a pesquisa do potencial biológico de extratos aquosos, etanólicos e realizados com acetato de etilo de engaços de uva tinta. Na discussão dos resultados deste estudo foi concluído que os extratos etanólicos e realizados com acetato de etilo apresentam melhor atividade antibacteriana e os engaços liofilizados apresentam boa atividade antifúngica (Radojević *et al.*, 2022).

No artigo de *Vázquez-Armenta et al.*, foi avaliada a capacidade antibacteriana de extratos metanólicos de engaços de uva de variedades brancas e tintas contra bactérias patogénicas Gram-positivo e Gram-negativo e foi encontrada sensibilidade diferencial para os diferentes extratos em estudo. Além disso, a atividade antibacteriana foi atribuída à inibição da enzima DNAGirase, porque os ácidos fenólicos podem se difundir através da membrana citoplasmática, aumentando a sua permeabilidade e conseqüentemente extravasamento dos constituintes intracelulares. Foi comprovado ainda que os ácidos hidroxicinâmicos podem interagir melhor com a membrana celular devido a serem compostos menos polares em comparação com os ácidos hidroxibenzóicos (Vázquez-Armenta *et al.*, 2017).

No artigo de *Sharma et al.*, onde foi estudada a atividade antioxidante e antibacteriana da *Vitis vinifera*, é referido que a atividade antimicrobiana presente na videira está ligada à presença de taninos que têm capacidade de inativar adesões microbianas, enzimas e proteínas de transporte (Sharma *et al.*, 2021).

No artigo de *Leal et al.*, foram estudados os compostos bioativos da uva branca como potenciais agentes antimicrobianos. O estudo, relata que as ações bactericidas dos compostos fenólicos da uva dependem de vários fatores como alterações na morfologia celular, no conteúdo de DNA, interação com enzimas e substratos e privação de iões metálicos. Aborda que ocorreu maior eficácia de inibição do crescimento de bactérias Gram-positivo comparando com Gram-negativo. Esta diferença deve-se essencialmente á constituição da parede celular das bactérias Gram-negativo que possuem uma membrana externa adicional na parede, com canais porina, que faz com que esta membrana externa seja uma forte barreira de entrada de compostos, nomeadamente antibióticos em uso na clínica, devido a ser bastante hidrofílica, cargas contrárias e tamanho do canal de porina (exemplo a vancomicina por ser uma molécula grande não entra, logo não atua este tipo de bactérias). A parede das bactérias Gram-positivo tem apenas uma camada de peptidoglicano, sem membrana externa, sendo por isso mais simples permitindo a entrada de compostos lipofílicos (*Leal et al.*, 2020).

Por último no artigo de *Simonetti et al.*, foi abordado o estudo sobre atividade antifúngica de compostos fenólicos em diferentes matrizes de *Vitis vinífera*. Neste artigo é demonstrado que o resveratrol é um indutor de apoptose em *C. albicans* ativando a metacaspase e promovendo a libertação de citocromo C (*Simonetti et al.*, 2020).

Posto isto, deverão ser efetuados mais estudos neste tipo de compostos porque reunindo toda a informação existente do engaço de uva podemos deduzir que o mesmo tem atividade antimicrobiana presente o que poderá ser uma solução viável e sustentável ao nível da indústria farmacêutica. Como se verificou nesta dissertação deverá ser efetuada uma técnica precisa, utilizando um solvente adequado às circunstâncias e uma quantidade de engaço com máxima concentração ou utilizando outros subprodutos da vinha, como as grainhas. Isto deve-se ao facto de que a atividade antioxidante e antimicrobiana do engaço da uva não depende somente da reatividade química, mas também de fatores como localização física, interação com outros componentes e as condições climáticas e edáficas.

IV. CONCLUSÃO

Os vários subprodutos da vinha, incluindo a uva, já são consumidos há cerca de dois milhões de anos. Diversos trabalhos de investigação com este tipo de amostra originária da vinha têm evidenciado que o consumo tem efeitos benéficos potencialmente associados à atividade antioxidante, cardioprotetora e antimicrobiana. Estes subprodutos e resíduos da vinha são ricos em compostos bioativos, cujos benefícios já foram aqui descritos, sendo importantes na prevenção de doenças e sendo potencialmente benéficos para a saúde. Dentro desses compostos bioativos temos os polifenóis, incluindo flavonóides.

Os benefícios que podem ajudar na manutenção de uma boa saúde e reaproveitando estes subprodutos como matérias-primas importantes como em alternativa de reciclar e criar o mínimo impacto ambiental, uma vez que o seu abundante conteúdo em compostos bioativos pode vir a permitir a criação de produtos inovadores, sustentáveis e promotores de uma boa saúde.

Esta dissertação permite identificar o potencial dos engaços de *Vitis vinifera* para aplicação em vários setores biotecnológicos, incluindo as indústrias cosmética, alimentar e farmacêutica, sendo uma abordagem possível para desenvolver novas formas de valorização destes subprodutos. Neste sentido, é imprescindível estimular a pesquisa e desenvolver novas aplicações destes subprodutos da vinha, sejam eles utilizados na forma integral ou em forma de extrato, para diferentes finalidades a fim de proporcionar vantagens económicas, sociais e ambientais nestes setores envolvidos.

Neste trabalho foi comprovada a atividade antioxidante, mas quanto à atividade antibacteriana e antifúngica não foram obtidos resultados que comprovem a sua eficácia como era esperado tal facto pode dever-se a vários fatores tais como as diferenças entre os extratos dependerem diretamente do tipo de solvente, do método de extração e da concentração dos metabolitos secundários. Infelizmente, a eficácia de produtos naturais como antimicrobianos é significativamente inferior em comparação com moléculas sintéticas convencionais, esta falta de eficácia é a principal razão para um número muito limitado de produtos e fármacos comercializados derivados de extratos vegetais, mas atualmente as resistências aos antibióticos convencionais tem se tornado uma das maiores ameaças

de saúde pública e à segurança alimentar. Segundo o relatório do Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças (ECDC), mais de 35 mil pessoas perderam as suas vidas anualmente na Europa entre 2016 e 2020, devido a infeções provocadas por resistências a antimicrobianos. Por este motivo, devem ser tomadas medidas na sociedade de forma a reduzir o impacto e limitar a propagação destas resistências, algumas dessas medidas incluem a redução do uso de antimicrobianos e a procura e investigação em novos compostos que possam ser aplicados em substituição e/ou utilizados sinergicamente com antimicrobianos convencionais que acelera a eliminação dos patogéneos. Futuramente gostaríamos de prosseguir com esta investigação no sentido de testar as terapias de combinação com os extratos aqui abordados, e assim incutir a diminuição dos produtos sintéticos e dos efeitos colaterais que estes provocam. Com isto potenciamos e incentivamos, também, a proteção do meio ambiente reduzindo a perda e o desperdício destes subprodutos da vinha para evidenciar os seus benefícios tornando assim estes mais sustentáveis.

Em suma, é necessário que se continue a investigar no sentido de desenvolver métodos de extração mais eficientes e precisos e condições experimentais que possam extrair da videira concentrações mais altas de polifenóis de forma mais eficiente e eficaz de comprovarem devidamente os seus benefícios tanto como antioxidantes como antimicrobianos e quais as vantagens que pode desencadear na sociedade. Portanto neste contexto deverão ser efetuados mais estudos para avaliar a toxicidade destes subprodutos, bem como, analisar as propriedades biológicas de cada um dos compostos bioativos presentes no engaço da uva a fim de obter a maior eficácia possível e assim aumento da biodisponibilidade e do metabolismo destes fitoquímicos.

V. BIBLIOGRAFIA

- Amaral, L. *et al.* (1996). Inhibition of the respiration of multi-drug resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by thioridazine: potential use for initial therapy of freshly diagnosed tuberculosis. pp. 1049-1053.
- Averilla, J. N. *et al.* (2019). Potential health benefits of phenolic compounds in grape processing by-products. pp. 1607–1615.
- Baiano, A. (2014). Recovery of Biomolecules from Food Wastes. pp. 14821-14842.
- Barros, A. *et al.* (2014). Evaluation of grape (*Vitis vinifera* L.) stems from Portuguese varieties as a resource of (poly)phenolic compounds: A comparative study. pp. 375-384.
- Bona, E. A. M. D. *et al.* (2014). Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Arquivos do Instituto Biológico*, 81(3), pp. 218-225.
- Castilho, A. L. d. *et al.* (2014). In vitro activity of Amazon plant extracts against *Enterococcus faecalis*. pp. 769-779.
- Cerqueira, F. *et al.* (2021). Mechanism of Antifungal Activity by 5-Aminoimidazole-4-Carbohydrazonamide Derivatives against *Candida albicans* and *Candida krusei*. pp. 1-13.
- Cheung, G. Y. C., Bae, J. S. e Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. pp. 547-569.
- Cirak, C. e Radusiene, J. (2019). Factors affecting the variation of bioactive compounds in *Hypericum* species. pp. 198–209.
- CLSI (2009). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. pp. 1-25.
- Costa, A. S. G. *et al.* (2018). Nutritional, chemical and antioxidant/pro-oxidant profiles of silverskin, a coffee roasting by-product. pp. 28-35.
- Costa, A. S. G. *et al.* (2014a). Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. pp. 350-357.
- Costa, E. *et al.* (2014b). Anthocyanin profile and antioxidant activity from 24 grape varieties cultivated in two portuguese winw regions. pp. 51-62.
- Dani, C. *et al.* (2010). Phenolic content of grapevine leaves (*Vitis labrusca* var. Bordo) and its neuroprotective effect against peroxide damage. pp. 148-153.

- David, C. Q. A. e J. M. *et al.* (2010). MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO EM SUBSTRATOS ORGÂNICOS. pp. 2202-2210.
- Fesharaki, S. H. *et al.* (2018). Catheter-related candidemia and identification of causative *Candida* species in patients with cardiovascular disorder. pp. 7-13.
- Galiniak, S., Aebisher, D. e Bartusik-Aebisher, D. (2019). Health benefits of resveratrol administration. pp. 13-21.
- Georgiev, V., Ananga, A. e Tsoleva, V. (2014). Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals. pp. 391-415.
- Gómez-Gaviria, M. e Mora-Montes, H. M. (2020). Current Aspects in the Biology, Pathogeny, and Treatment of *Candida krusei*, a Neglected Fungal Pathogen. pp. 1673–1689.
- Gouvinhas, I. *et al.* (2020). Enhanced phytochemical composition and biological activities of grape (*Vitis vinifera* L.) Stems growing in low altitude regions. pp. 1-7.
- Jamiu, A. T. *et al.* (2020). Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. pp. 1-17.
- Jampilek, J. (2022). Drug repurposing to overcome microbial resistance. pp. 2028-2036.
- Joshi, D. R. e Adhikari, N. (2019). An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity. pp. 1-18.
- Kaur, R. *et al.* (2017). Fungal Opportunistic Pneumonias in HIV/AIDS Patients: An Indian Tertiary Care Experience. pp. 14-19.
- Kaushik, P. *et al.* (2017). Phenolics content, fruit flesh colour and browning in cultivated eggplant, wild relatives and interspecific hybrids and implications for fruit quality breeding. pp. 392–401.
- Kazakova, E. e Lee, J. (2022). Sustainable Manufacturing for a Circular Economy. pp. 1-17.
- Laborclin (2019). SABOURAUD CALDO. pp. 1-2.
- Leal, C. *et al.* (2020). Recovery of bioactive compounds from white grape (*Vitis vinifera* L.) stems as potential antimicrobial agents for human health. pp. 1009–1015.
- Leala, C. *et al.* (2020). Potential application of grape (*Vitis vinifera* L.) stem extracts in the cosmetic and pharmaceutical industries: Valorization of a by-product. pp. 1-10.
- Lee, A. S. *et al.* (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. pp. 1-19.

- Lia, L. e Sun, B. (2019). Grape and wine polymeric polyphenols: Their importance in enology. pp. 563–579.
- Lima, A. F. *et al.* (2017). Evaluation of the phenolic content and antioxidant activity of grapevine leaves in order to use them as food. pp. 140-146.
- Lopes, J. P. e Lionakis, M. S. (2022). Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. pp. 89-121.
- M7-A6, N.-. (2003). Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada - Sexta Edição. pp. 27-81.
- M27-A2, N.-. (2002). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Second Edition. pp. 21-51.
- Maia, M. *et al.* (2021). More than Just Wine: The Nutritional Benefits of Grapevine Leaves. pp. 1-12.
- Moldovan, M. L. *et al.* (2020). Phytochemical Profile and Biological Activities of Tendrils and Leaves Extracts from a Variety of *Vitis vinifera* L., pp. 1-20.
- Niculescu, V.-C. e Ionete, R.-E. (2023). An Overview on Management and Valorisation of Winery Wastes. pp. 1-17.
- Nyadanu, D. *et al.* (2020). Mapping spatial distribution of genetic resources of kola (*Cola nitida* (Vent.) Schott & Endl.) in Ghana and collection of germplasm for conservation, characterization and development of improved varieties. pp. 69–77.
- Poirel, L. *et al.* (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. pp. 1-16.
- Pospíšilová, Š. *et al.* (2020). Dibasic Derivatives of Phenylcarbamic Acid as Prospective Antibacterial Agents Interacting with Cytoplasmic Membrane. pp. 1-18.
- Prusova, B. *et al.* (2020). Polyphenolic composition of grape stems. pp. 1543-1559.
- Radojević, I. D. *et al.* (2022). Grape stalks as a source of antioxidant and antimicrobial substances and their potential application. pp. 179-186.
- Riley, L. W. (2020). Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: *Escherichia coli*. pp. 1-2.
- Rouxinol, M. I. *et al.* (2023). Climate Effect on Morphological Traits and Polyphenolic Composition of Red Wine Grapes of *Vitis vinifera*. pp. 1-15.
- Schnee, S. *et al.* (2013). *Vitis vinifera* Canes, a New Source of Antifungal Compounds against *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, and *Botrytis cinerea*. pp. 5459–5467.

- Schwartz, C. G. K. *et al.* (2020). Compostos bioativos do bagaço de uva (*Vitis vinífera*): seus benefícios e perspectivas para o desenvolvimento sustentável. pp. 485-500.
- Shafieia, M. *et al.* (2020). History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action. pp. 0045-2068.
- Sharma, G. N. *et al.* (2021). Antioxidant and Antibacterial Activity of *Vitis Vinifera*. pp. 112-118.
- Silveira, A. C. d. *et al.* (2018). Método de DPPH adaptado: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de frutos da erva-mate de forma rápida e reprodutível. pp. 2-10.
- Simonetti, G., Brasili, E. e Pasqua, G. (2020). Antifungal Activity of Phenolic and Polyphenolic Compounds from Different Matrices of *Vitis vinifera* L. against Human Pathogens. pp. 1-22.
- Soares, B., Pinto, T. e Pereira, L. (2020). Tinta Roriz. pp.
- Sousa, C., Vinha, A. F. e Nunes, A. (2017). Desperdícios da vinicultura: potenciais aplicações e sustentabilidade. pp. 1-65.
- Sucupiraa, N. R. *et al.* (2012). Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. pp. 263-269.
- Talapko, J. *et al.* (2021). *Candida albicans*—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. pp. 1-13.
- Va'zquez-Armenta, F. J. *et al.* (2017). Antibacterial and antioxidant properties of grape stem extract applied as disinfectant in fresh leafy vegetables. pp. 3192–3200.
- Vestergaard, M. e Ingmer, H. (2019). Antibacterial and antifungal properties of resveratrol. pp. 716-723.
- Vilela, A., Martins, S. e Cosme, F. (2016). Perfil Sensorial e Fenólico de Vinhos Brancos Monovaretais produzidos com Castas Brancas cultivadas na Região Demarcada do Douro. pp. 1-8.
- Vinha, A. *et al.* (2022). FITOQUÍMICOS DO BAGAÇO DA UVA: INGREDIENTE FUNCIONAL EM PRODUTOS CÁRNEOS. pp. 62-74.