

Joana Catarina Cardoso Ferreira

**Potencial dos subprodutos da viticultura portuguesa como recursos naturais de
compostos bioativos**

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2023

Joana Catarina Cardoso Ferreira

**Potencial dos subprodutos da viticultura portuguesa como recursos naturais de
compostos bioativos**

Faculdade de Ciências da Saúde

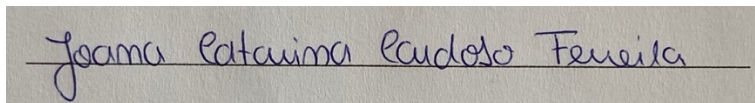
Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2023

Joana Catarina Cardoso Ferreira

Potencial dos subprodutos da viticultura portuguesa como recursos naturais de compostos bioativos

Atesto a originalidade do trabalho,

A rectangular box containing a handwritten signature in blue ink. The signature reads "Joana Catarina Cardoso Ferreira" and is written over a horizontal line.

(Joana Catarina Cardoso Ferreira)

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

Orientador: Professora Doutora Maria de Fátima Araújo Magalhães Cerqueira

Coorientador: Professora Doutora Carla Alexandra Lopes Andrade de Sousa e Silva

Porto, 2023

RESUMO

Vitis vinifera é a variedade de uva utilizada na produção de vinho e outros produtos, sendo cultivada por todo o mundo. No processo de produção de vinho muitos são os subprodutos da videira que são desperdiçados, entre eles as folhas, as sementes e os engaços. Estes subprodutos apresentam uma importante atividade biológica para a saúde. Estudos recentes demonstraram que várias são as partes da videira que tem na sua composição polifenóis, compostos que são benéficos para a saúde, dado que apresentam atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, cardioprotetora, o que tem despertado cada vez mais interesse junto da comunidade científica. Dada a quantidade de vinho produzido a nível mundial, a quantidade destes subprodutos começa a ser um problema a nível ambiental, tornando-se assim urgente tomar medidas para a utilização destes para obter compostos bioativos com aplicações quer a nível da indústria farmacêutica, quer na medicina ou até a nível alimentar. Nesta dissertação avaliou-se a atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de grainhas e engaços de duas castas portuguesas, a Touriga Franca e a Touriga Nacional, obtidos com três solventes extratores, sendo eles, água, etanol e uma mistura hidroalcoólica. Foram avaliados o teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais presentes nos diferentes extratos, e ainda, a atividade antioxidante por espectrofotometria. Para avaliação da atividade antibacteriana (contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) e antifúngica (contra *Candida albicans* e *Candida krusei*) dos extratos recorremos ao Método de Microdiluição e determinação da Concentração Mínima Inibitória, usualmente utilizados na pesquisa de novos antimicrobianos. Por fim foi ainda avaliado o mecanismo de ação dos extratos no que respeita à capacidade de matar ou inibir o crescimento dos microrganismos à concentração máxima estudada. De um modo geral, a Touriga Nacional apresenta resultados mais promissores, desde o seu teor em compostos fenólicos e flavonoides à atividade antioxidante, e ainda na atividade antimicrobiana. Na atividade antimicrobiana as grainhas apresentam, de modo geral, melhores resultados que os engaços.

Palavras-chave: Subprodutos, Vinha, Antifúngicos, Touriga Franca, Touriga Nacional, Antibacterianos, Antioxidantes, Compostos Fenólicos

ABSTRACT

Vitis vinifera is a variety of grapes used in the production of wine and other products being cultivated throughout the whole world. In the wine production process, many subproducts are wasted, including leaves, seeds, and stalks. These subproducts have an important biological activity in terms of health. Recent studies have demonstrated that several parts of the vine have polyphenols in their composition, compounds that are beneficial to health, as they have antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and cardioprotective activities, which has aroused increasing interest among the scientific community. Given the amount of wine produced worldwide, the amount of these subproducts it is beginning to be an environmental problem, making it urgent to take action and to use them to obtain bioactive compounds with applications both in the pharmaceutical industry and in medicine, or even at the food level. In this dissertation, it was evaluated the antioxidant and antimicrobial activity of extracts from seeds and stalks of two Portuguese grape varieties, Touriga Franca and Touriga Nacional, obtained with three extracting solvents, namely water, ethanol and a hydroalcoholic mixture. The content of total phenolic compounds and total flavonoids present in the different extracts were evaluated, as well as the antioxidant activity by spectrophotometry. To evaluate the antibacterial activity (against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*) and antifungal activity (against *Candida albicans* and *Candida krusei*) of the extracts, we used the Microdilution Method and determination of the Minimum Inhibitory Concentration, usually used in the search for new antimicrobials. Finally, the mechanism of action of the extracts was also evaluated regarding the ability to kill or inhibit the growth of microorganisms at the maximum concentration studied. In general, Touriga Nacional presents more promising results, from its content of phenolic compounds and flavonoids to its antioxidant activity, and its antimicrobial activity. In terms of antimicrobial activity, seeds generally present better results than stalks.

Keywords: Subproducts, Vine, Antifungals, Touriga Franca, Touriga Nacional, Antibacterials, Antioxidants, Phenolics compounds

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação de mestrado tornou-se um percurso com altos e baixos, com muitas dificuldades e desafios, mas também com muitas alegrias e superação, que sem o apoio e incentivo de todos os envolvidos neste projeto não se teria tornado uma realidade. A todos estarei eternamente grata.

Aos meus pais, por todo o esforço investido na minha educação, por sempre me incentivarem e acreditarem que eu seria capaz de superar os obstáculos que a vida me apresentou, por serem o meu pilar e me tornarem a mulher que sou hoje. São os melhores pais do mundo.

À minha irmã, por ser a melhor irmã do mundo, um dos meus maiores pilares nesta jornada e na vida toda, por todos os conselhos e mimos que me deu. És o meu orgulho!

À minha família pelo apoio que sempre me deram durante toda a minha vida.

À Belém, por todos os conselhos, ensinamentos, apoio e carinho que sempre me deu a minha vida toda, sem dúvida um pilar muito importante.

Aos meus avós, que são as minhas estrelinhas que sempre me guiaram neste percurso. E à minha avó que me acompanha de perto, por todo o amor e carinho.

Ao meu namorado, que me apoiou incondicionalmente na reta final deste percurso. Com toda a paciência mostrou-me que eu era capaz de conquistar mais uma etapa da minha vida. Obrigada por nunca me deixares desistir, por seres casa. Sem ele não teria sido igual.

À minha Barbara, por ter partilhado comigo estes 5 anos, por ser a amiga de todas as horas, um apoio incondicional. Por todas as horas de estudo, por todas as aulas práticas, por todos os abraços e carinhos. Por seres casa. És, sem dúvida das amizades mais bonitas, que sei que vou levar comigo para a vida. Para o que der e vier, estarei sempre aqui.

À minha amiga, Andreia, por ter partilhado comigo estes 5 anos, por ser tão especial. Por todas as horas de estudo, por ser o ombro amigo em tantas horas, por nunca me deixar

desistir e sempre me dar a mão. E em especial por me acompanhar neste, que é o nosso projeto, sem ela isto não seria possível. Vou levar-te comigo sempre.

À minha amiga, Marta, que nestes últimos anos tornou este percurso muito mais especial, por todo o amor e carinho.

À minha Naomi, que mesmo longe está sempre perto, por todos estes anos de amizade, por seres casa e seres o meu apoio incondicional a todas as horas. A vida é mais bonita contigo nela.

A todos os meus amigos, por todas as memórias e por me darem o apoio para nunca desistir e lutar sempre pelos meus sonhos, muito obrigada.

À minha orientadora Professora Doutora Fátima Cerqueira por aceitar orientar o meu trabalho de pesquisa, por todo o incentivo, paciência e pela dedicação do seu tempo a este projeto tão especial.

À minha coorientadora Professora Doutora Carla Sousa e Silva por toda a informação transmitida e executada ao longo deste projeto.

À Universidade Fernando Pessoa e todos os docentes e não docentes, que ao longo destes 5 anos se cruzaram no meu percurso académico, por todos os ensinamentos e experiências partilhadas.

A todos o meu sincero agradecimento!

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
AGRADECIMENTOS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. Contexto teórico	1
1.2. Motivação	11
1.3. Objetivos.....	11
II. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1. Amostras	13
2.2. Reagentes e Padrões	13
2.3. Preparação dos extratos	14
2.4. Teor de fenólicos totais.....	15
2.5. Teor de flavonoides totais.....	15
2.6. Atividade antioxidante.....	16
2.6.1. Método DPPH	16
2.6.2. FRAP	16
2.7. Microrganismos	17
2.8. Preparação das suspensões dos extratos secos	17
2.9. Avaliação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos extratos pela técnica de microdiluição	17
2.9.1. Avaliação da atividade antifúngica dos extratos	18
2.9.2. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos.....	19
2.10. Concentração mínima letal (CML).....	19
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
3.1. Teores de compostos fenólicos e flavonoides totais das grainhas e engaços	21
3.2. Capacidade antioxidante de grainhas e engaços.....	24
3.3. Avaliação da atividade dos extratos de grainhas e engaços como antifúngicos..	27

3.3. Avaliação da atividade dos extratos de grainhas e engaços como antibacterianos	31
3.4 Mecanismo de ação fungistático/ fungicida ou bacteriostático/ bactericida dos extratos de grainhas	35
IV. CONCLUSÃO.....	37
IV. BIBLIOGRAFIA.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Touriga Franca - uvas e folha (retirado de (Soares <i>et al.</i> , 2020a)).....	4
Figura 2: Touriga Nacional - uvas e folha (retirado de (Soares <i>et al.</i> , 2020b)).....	5
Figura 3: Grainhas de uva.....	5
Figura 4: Engaços das videiras	6
Figura 5: Esquema das placas de 96 poços.....	19
Figura 6: Esquema das placas para avaliação da concentração mínima letal.....	20

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Teor de compostos fenólicos e flavonoides e capacidade antioxidante das grainhas das castas estudadas	22
Tabela 2: Teor de compostos fenólicos e flavonoides e capacidade antioxidante dos engaços das castas estudadas	23
Tabela 3: Concentrações mínimas inibitórias dos extratos de grainhas em <i>C. krusei</i>	27
Tabela 4: Concentrações mínimas inibitórias dos extratos dos engaços em <i>C. krusei</i>	28
Tabela 5: Concentrações mínimas inibitórias dos extratos de grainhas em <i>C. albicans</i>	29
Tabela 6: Concentrações mínimas inibitórias dos extratos dos engaços em <i>C. albicans</i>	30
Tabela 7: Concentrações mínimas inibitórias dos extratos de grainhas em <i>S. aureus</i>	32
Tabela 8: Concentrações mínimas inibitórias dos extratos dos engaços em <i>S. aureus</i>	33
Tabela 9: Concentrações mínimas inibitórias dos extratos de grainhas em <i>E. coli</i>	34
Tabela 10: Concentrações mínimas inibitórias dos extratos dos engaços em <i>E. coli</i>	34
Tabela 11: Mecanismo de ação fungistático/ fungicida ou bacteriostático/ bactericida dos extratos de grainhas a 200 µg/mL	36

LISTA DE ABREVIATURAS

C. albicans – *Candida albicans*

C. krusei – *Candida krusei*

CMI – Concentração mínima inibitória

CML – Concentração mínima letal

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

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

E. coli – *Escherichia coli*

EAG – Equivalentes de ácido gálgico

EC – Equivalentes de catequina

ET – Equivalentes de trolox

FRAP – Poder antioxidante da redução do ferro

ESF – Equivalentes de sulfato ferroso

HIV/SIDA – Vírus de Imunodeficiência Humana / Síndrome da Imunodeficiência Humana

MH II – Mueller-Hinton II

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

SDB – Sabourad dextrose Broth

TFC – Compostos flavonoides totais

TPC – Compostos fenólicos totais

TPTZ – Solução de Tripiridiltriazina

I. INTRODUÇÃO

1.1. Contexto teórico

Atualmente existem dois grandes problemas a nível mundial; o aumento da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos e a falta de soluções para estas resistências. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de contribuir para a resolução deste problema, estudando a atividade antimicrobiana de subprodutos da viticultura, promovendo assim uma maior sustentabilidade.

Vitis vinifera, variedade de uva utilizada na produção de vinho e outros produtos, é cultivada em diversas regiões de todo o mundo, resultando numa produção mundial superior a 68 milhões de toneladas. Somente no ano de 2010, Portugal produziu mais de 945 mil toneladas de uvas (Fernandes *et al.*, 2013), sendo que, apenas 80% das colheitas são utilizadas para a produção de vinho (Sousa *et al.*, 2017). Apesar de uma leve diminuição nas áreas de cultivo de vinhas, a nível mundial, nas últimas duas décadas, a produção de uvas aumentou devido ao acréscimo da produtividade média. O continente europeu continua a ser o principal produtor de vinho (Sousa *et al.*, 2017).

A indústria de produção de vinho gera milhares de toneladas de subprodutos que contêm compostos benéficos para a saúde, como compostos fenólicos e fibras. Esses subprodutos incluem a pele da uva, as sementes, o engaço e a borra, que são rejeitados, durante a produção de vinho e podem ser considerados fontes baratas de compostos bioativos. No processo de produção, cerca de 13% do peso da uva corresponde às grainhas (Mattos *et al.*, 2017) e aproximadamente 25% do total de subprodutos é proveniente do engaços (Leal *et al.*, 2020b). Anualmente, mais de 3 milhões de toneladas de grainhas são descartadas em todo o mundo, sendo que Portugal contribui com cerca de 47 mil toneladas desse total (Fernandes *et al.*, 2013). No processo de vinificação, o engaço é o primeiro subproduto a ser obtido, sendo que apresenta uma produção média de 3,5 Kg/hL de vinho. Sabendo que a média anual de produção de vinho é de 7 milhões de hectolitros, é possível estimar uma quantidade aproximada de 24,5 milhões de Kg de engaços de uva por ano (Prozil *et al.*, 2013). Essa quantidade considerável de resíduos suscita questões relacionadas com o aproveitamento sustentável desses subprodutos da indústria vitivinícola. Considerando que vivemos numa sociedade que lida com desafios

ambientais todos os dias, nomeadamente o destino de resíduos industriais, a valorização e reutilização das sementes das uvas é altamente significativa (Fernandes *et al.*, 2013).

A indústria agroalimentar desempenha um papel crucial na busca pela sustentabilidade ao adotar práticas agrícolas como a agricultura orgânica, a conservação do solo e ainda o uso responsável de água. Estas práticas promovem segurança alimentar a longo prazo, sem comprometer os recursos naturais para as gerações futuras, mesmo com o crescimento da população mundial (Sousa *et al.*, 2017).

Para que haja um desenvolvimento sustentável, é necessário que o modelo de produção e de consumo mude de um modelo económico linear, cuja premissa é “produz-utiliza-deita fora” para um modelo de “economia circular”, no qual se defende a ideia de reduzir os desperdícios e reaproveitar os resíduos, reciclando-os, diminuindo os gastos económicos e o desgaste ambiental (Niculescu *et al.*, 2023);(Parlamento Europeu, 2023 – Economia circular: definição, importância e benefícios). Desta forma, promove-se um equilíbrio sustentável e rentável entre as 3 grandes vertentes da sustentabilidade: económica, ambiental e social (Sousa *et al.*, 2017; Zambon *et al.*, 2018).

Na vertente económica deve existir um bom equilíbrio entre a produção e a proteção ambiental, isto é, deve-se ter em consideração os problemas ecológicos, de maneira a prevenir o seu agravamento e não produzir em demasia, mas também não negligenciar o crescimento económico pois este permite que as prioridades se alterem, nomeadamente que haja disponibilidade monetária para investir na proteção ambiental (Sousa *et al.*, 2017).

A grande utilização de recursos naturais, que já são escassos, e o aumento populacional cada vez mais sentido, não contribuem para a sustentabilidade ambiental. Tal tem efeitos negativos preocupantes a nível da litosfera, mas também da atmosfera, que sofre o efeito da poluição decorrente da atividade industrial, contribuindo para o efeito estufa e as alterações climáticas (Sousa *et al.*, 2017).

Desta forma, a gestão dos subprodutos produzidos pela atividade industrial é um dos desafios, mas também das funções fundamentais que a indústria agroalimentar tem de enfrentar, desafio este que tem de ser visto na perspetiva da sustentabilidade (Sousa *et al.*, 2017).

Este aproveitamento dos subprodutos está de acordo com a economia circular e permite a valorização dos produtos, antes considerados resíduos, conferindo vantagens económicas e ambientais. De facto, estes resíduos podem ser aproveitados e transformados em produtos rentáveis e/ou em produtos que conseguem substituir outros, cuja produção dependia de matéria-prima já escassa. A nível ambiental, o uso destes subprodutos consegue (i) diminuir o consumo dos recursos naturais, reduzindo simultaneamente os resíduos ambientais, que são reaproveitados, (ii) reduzir o consumo energético e (iii) dar origem a novas fontes energéticas, de que são exemplos o biocarvão, o biocombustível e o bioetanol (Sousa *et al.*, 2017; Niculescu *et al.*, 2023); (Parlamento Europeu, 2023 – Economia circular: definição, importância e benefícios).

A nível social também se retiram vantagens da mudança para uma economia circular e, por consequência do aproveitamento dos subprodutos, pois esta faz com que se criem novas áreas de produção, o que origina novos postos de trabalho (Sousa *et al.*, 2017). Para além disso, conseguem-se criar e fornecer aos consumidores produtos mais duradouros, o que permite uma maior poupança e, a longo prazo, uma melhoria na qualidade de vida (Parlamento Europeu, 2023 – Economia circular: definição, importância e benefícios).

Desta forma, as três vertentes da sustentabilidade promovem a diminuição dos custos de produção, o aumento da rentabilidade dos produtos, assim como o desenvolvimento de novos produtos para consumo humano (Fernandes *et al.*, 2013).

Tal como anteriormente referido, o objetivo deste trabalho passa pelo estudo das atividades antioxidante e antimicrobiana de subprodutos da viticultura. A viticultura começou por ser uma cultura europeia, mas com o passar dos anos começou a ser feita em todo o mundo (Mattos *et al.*, 2017). Em Portugal é uma das atividades económicas mais importantes (Moreira *et al.*, 2018). Para este estudo usaram-se duas castas diferentes, a Touriga Franca e a Touriga Nacional, sendo das mais cultivadas no nosso país (Soares *et al.*, 2020a).

A Touriga Franca, cujos bagos e folha estão representados na figura 1, é uma casta de uva tinta tradicional do Douro, sendo a segunda casta mais cultivada em Portugal. Apresenta um bago arredondado, médio, negro-azul com uma película medianamente espessa e ainda uma polpa mole. Para esta casta devem-se evitar os solos muito férteis, profundos e húmidos. É uma casta robusta, mas suscetível à podridão cinzenta e ao oídio, assim

como muito sensível à traça da uva, mas tolerável à cigarrinha verde. A Touriga Franca é usada entre outros, para produzir Vinho Porto e Vinho Rosé. Os óleos de grainha desta casta são ricos em derivados da família da vitamina E e em ácidos gordos; já os extratos de película e grainhas apresentam compostos antioxidantes com utilidade para conservar alimentos (Soares *et al.*, 2020a).



Figura 1: Touriga Franca - uvas e folha (retirado de (Soares *et al.*, 2020a))

A Touriga Nacional, cujos bagos e folha estão representados na figura 2, é uma casta de uva tinta e está espalhada por várias regiões de Portugal: Alentejo, Lisboa, Tejo, Algarve, Setúbal, Bairrada e Açores. Sendo a sua origem proveniente da região do Douro e/ou Dão, esta é a terceira casta mais cultivada em Portugal. Apresenta um bago ligeiramente achatado, médio, negro-azul e película medianamente espessa e ainda uma polpa mole. Nesta casta devem-se evitar solos muito férteis e húmidos. É uma casta que é suscetível ao stresse hídrico e térmico, assim como ao vento. É muito sensível à escoriose, mas pouco sensível ao míldio, oídio, cigarrinha verde e traça da uva. A Touriga Nacional é usada para produzir Vinho Porto, Vinho Rosé e Espumante. Os óleos das grainhas da Touriga Nacional são ricos em ácidos gordos e derivados da família vitamina E. Os extratos de película e grainha tem na sua composição compostos antioxidantes, com potencial para preservantes alimentares (Soares *et al.*, 2020b).



Figura 2: Touriga Nacional - uvas e folha (retirado de (Soares *et al.*, 2020b))

Estudos já demonstraram que a Touriga Nacional adapta-se menos à seca que a Touriga Franca. Desta forma, a Touriga Franca mostrou uma resposta mais benéfica em termos de produção, com uma maior quantidade de uvas produzidas para o mesmo modelo de irrigação aplicado às duas castas (Barreales *et al.*, 2018).

Neste contexto, foram estudados dois dos subprodutos da vinha: as grainhas e os engaços. As grainhas ou sementes das uvas, que se podem ver na figura 3, apresentam um perfil nutricional bastante rico, constituído por cerca de 40% de fibras alimentares, 16% de óleos essenciais, 11% de proteínas e ainda 7% de compostos fenólicos (Mattos *et al.*, 2017). Os principais compostos fenólicos presentes nas grainhas são os flavan-3-óis. O teor nestes constituintes é influenciado por múltiplos fatores, tais como, fertilização do solo, irrigação, atraso na colheita e o armazenamento, mas também pela própria forma de cultivo (Simonetti *et al.*, 2020). Devido ao elevado teor destes compostos, as grainhas apresentam atividade antioxidante e antimicrobiana (Mattos *et al.*, 2017).



Figura 3: Grainhas de uva

Já os engaços das videiras, que se podem observar na figura 4, têm origem lenhocelulósica, sendo constituídos por cerca de 30% de celulose, 21% de hemicelulose, cerca de 17% de lenhina, 15-16% de taninos e ainda aproximadamente 6% de proteínas (Prozil *et al.*, 2013). Estes subprodutos apresentam ainda um elevado teor em minerais essenciais. É de referir que possuem uma composição mais rica em minerais e compostos fenólicos que algumas matrizes alimentares presentes na nossa alimentação. A concentração de minerais nos engaços depende de vários aspetos, tais como as características do solo em que a videira se encontra, as condições climáticas que influenciam a taxa de transpiração e a própria acumulação de minerais no fruto (Leal *et al.*, 2021). Os engaços apresentam atividades biológicas como antimicrobiana, antioxidante e ainda anti-inflamatória (Leal *et al.*, 2020b).



Figura 4: Engaços das videiras

No âmbito deste trabalho, preparam-se extratos de grainhas e de engaços de videira. A composição e as propriedades dos extratos variam consideravelmente com as condições de extração escolhidas, tais como o tipo de solvente usado, nomeadamente com a sua polaridade, a temperatura a que se faz a extração e ainda a duração da mesma (Costa *et al.*, 2018). O tipo de matriz e as propriedades químicas dos compostos fenólicos e dos polifenóis, designadamente a sua estrutura molecular, polaridade, concentração, o número de anéis aromáticos e o número de grupos hidroxilo, são outros aspetos importantes a ter em consideração na altura de fazer a sua extração. Dada a variabilidade destes fatores e características, é difícil escolher um método único no que toca à extração, separação e purificação destes compostos (Simonetti *et al.*, 2020).

É necessário ter em atenção que a composição fenólica dos subprodutos da vinha é influenciada pelas condições de cultivo da mesma, fatores climáticos, localização geográfica, práticas de cultivo e ainda pelo estágio de maturação (Leal *et al.*, 2020b; Simonetti *et al.*, 2020). Alguns estudos mostraram já que o teor de fenóis totais e de flavonoides é maior em locais de menor altitude (Leal *et al.*, 2020b). O stress hídrico é outro parâmetro importante, visto que reduz a atividade fotossintética das plantas ao mínimo para evitar perdas de água. Nesta situação, os poucos compostos produzidos são transportados para os órgãos vitais para garantir a sobrevivência da planta. Por outro lado, a irrigação aumenta a produção, assim como o peso e diâmetros das uvas (Barreales *et al.*, 2018). Importa ainda referir que a variedade e a qualidade da vinha também são fatores importantes na composição das uvas, nomeadamente dos seus compostos fenólicos (Simonetti *et al.*, 2020).

Os compostos fenólicos, classificados em fenóis simples ou polifenóis, constituem cerca de 70% dos compostos bioativos encontrados nas frutas, são conhecidos pelo seu potencial antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiano (Mattos *et al.*, 2017; Troilo *et al.*, 2021), e são abundantes na uva. Devido a essas propriedades benéficas, os extratos obtidos a partir dos resíduos de uva, que são ricos em compostos fenólicos, podem ser utilizados no desenvolvimento de diversos produtos, desde aplicações médicas até alimentares (Mattos *et al.*, 2017; Troilo *et al.*, 2021). Esses extratos podem ajudar a diminuir o crescimento de microrganismos patogénicos que causam degradação e doenças, além de inibir a oxidação de lípidios (gorduras). (Mattos *et al.*, 2017).

Os flavonoides são compostos fitoquímicos encontrados em várias plantas, frutas e vegetais. Estes têm demonstrado uma variedade de atividades biológicas e o seu consumo através de uma dieta rica em alimentos vegetais pode contribuir para uma variedade de benefícios para a saúde. As suas características antioxidantes, anti-inflamatórias, antivirais, antibacterianas, neuroprotetoras, cardioprotetoras e anticancerígenas, entre muitas outras que cada vez mais são mais estudadas, têm suscitado muito interesse na pesquisa científica (Nassiri-Asl *et al.*, 2016; Ullah *et al.*, 2020). Os flavonoides além de serem capazes de inibir fatores de virulência dos microrganismos também apresentam efeito sinérgico com os antibióticos convencionais (Mattos *et al.*, 2017). As atividades biológicas dos flavonoides podem variar dependendo do tipo de flavonoide presente, bem

como o seu modo de ação no organismo. Tendo ainda atenção que a biodisponibilidade desempenha um papel importante nos efeitos destes compostos (Ullah *et al.*, 2020).

A resistência aos antibióticos é um dos maiores problemas atualmente, tornando-se uma verdadeira ameaça à saúde pública, e por outro lado à segurança alimentar, pelo que é urgente que sejam tomadas medidas no que toca a tentar reduzir o impacto e a propagação destas resistências. Estas medidas podem passar por uma redução no uso de antibióticos e a pesquisa de novos compostos que atuem em substituição dos antibióticos atualmente usados ou que atuem em sinergismo com estes (Leal *et al.*, 2020b). Nesta perspetiva, os flavonoides têm suscitado interesse devido às suas propriedades antimicrobianas. Para além disto, alguns estudos sugerem que estes compostos podem influenciar positivamente o sistema imunológico. Estes compostos podem atuar como bactericidas (matando os microrganismos) ou como bacteriostáticos (inibindo o crescimento bacteriano). De acordo com todas estas propriedades, os flavonoides são compostos promissores no âmbito da pesquisa de novos tratamentos de infeções bacterianas, especialmente as que são resistentes aos antibióticos tradicionais (Ullah *et al.*, 2020).

Para além deste problema de saúde pública, existe também a resistência aos antifúngicos tradicionais. De facto, os fungos infetam bilhões de pessoas todos os anos, sendo por isso responsáveis por um elevado número de infeções e, conseqüentemente, por altas taxas de mortalidade, em grande parte devido ao aumento das resistências destes microrganismos (Simonetti *et al.*, 2020). Estudos já realizados mostram que os compostos fenólicos apresentam atividade antifúngica, principalmente contra fungos patogénicos de plantas e contra contaminantes alimentares. Mas já existem alguns estudos que demonstram atividade contra patógenos humanos e animais. No que toca à atividade antifúngica dos compostos fenólicos e dos flavonoides existem vários estudos em diversas matrizes de *Vitis vinifera* (Aboody *et al.*, 2020; Simonetti *et al.*, 2020).

Neste projeto os microrganismos em estudo foram *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Foram selecionados estes microrganismos em específico pela sua predominância nas doenças humanas e ainda pelas suas resistências aos antimicrobianos, que surgem cada vez mais, devido aos mecanismos de resistência que estes vão desenvolvendo. Esta pesquisa deu relevância a substâncias naturais com

atividade antimicrobiana para enfrentar as resistências aos tratamentos convencionais e impulsionar a sustentabilidade dos produtos da vinha, que são relevantes para a saúde.

Candida albicans é um fungo comensal comum que está colonizado no nosso organismo, ou seja, está presente em diferentes áreas como a cavidade orofaríngea, o trato gastrointestinal e vaginal e ainda a pele em indivíduos saudáveis (Talapko *et al.*, 2021). *Candida albicans* apresenta vários fatores de virulência, que conferem a este microrganismo a capacidade de causar doenças, sendo estes, a adaptação à temperatura, variabilidade genética, produção de biofilmes e ainda a capacidade de mudar a sua morfologia entre a forma de levedura e hifa (Lopes *et al.*, 2022). Estas características permitem que *C. albicans* seja o agente que causa mais infeções mucocutâneas, sistémicas e oportunistas, sendo por esse facto a levedura responsável por aproximadamente 70% das infeções fúngicas em todo o mundo (Talapko *et al.*, 2021; Lopes *et al.*, 2022). Tem ainda de se ter em atenção que, apesar de existir tratamentos, as infeções por *C. albicans* apresentam uma taxa de mortalidade perto dos 40% (Talapko *et al.*, 2021). Existem vários grupos de pessoas que estão mais predispostos a contrariem uma infeção por este microrganismo, sendo estes: idosos; recém-nascidos e com baixo peso à nascença; grávidas; indivíduos com certas doenças como tumores, doenças do aparelho digestivo, endocrinopatias (diabetes, hipotireoidismo), doenças autoimunes e imunodeficiências primárias; doentes em tratamento anticancerígeno ou que frequentemente fazem tratamento antimicrobiano ou com corticoides; pessoas com deficiências nutricionais (ferro, ácido fólico e vitaminas), ou com infeções como por exemplo infeção pelo Vírus de Imunodeficiência Humana/Síndrome da Imunodeficiência Humana (HIV/SIDA) (Talapko *et al.*, 2021). A nível hospitalar e em internamentos é muito comum a candidíase oportunista. Para além dos longos períodos de internamento, o uso de cateteres e algálias são outros fatores que tornam esta infeção mais comum (Hashemi Fesharaki *et al.*, 2018).

Candida krusei pertence ao grupo de agentes etiológicos da candidíase, e mesmo não sendo isolado tantas vezes como outras espécies de *Candida*, tem especial importância por ser intrinsecamente resistente ao fluconazol (Gómez-Gaviria *et al.*, 2020) e ainda por conseguir facilmente adquirir novas resistências a outros antifúngicos (Jamiu *et al.*, 2021) o que torna as opções terapêuticas mais reduzidas para as infeções provocadas por esta levedura. Este microrganismo é responsável por causar infeções como, endocardite e, osteomielite. *C. krusei* apresenta alguns fatores de virulência, tais como, a transição

dimórfica, ou seja, transição entre levedura e pseudohifas, onde as pseudohifas são invasivas conseguindo invadir os tecidos do hospedeiro, e ainda a capacidade de formar biofilmes monoespécies ou biofilmes polimicrobianos com outros fungos ou bactérias (Jamiu *et al.*, 2021). Existem vários fatores de risco para as infeções causadas por esta levedura, tais como, o uso prolongado e desmedido de antimicrobianos, condições oncológicas e aumento do uso de dispositivos médicos (como implantes artificiais) (Jamiu *et al.*, 2021).

Escherichia coli é um bacilo de Gram-negativo, que apesar de fazer parte da flora comensal intestinal humana e de outros mamíferos, causa uma grande diversidade de infeções humanas, fazendo parte as infeções extraintestinais e doenças gastrointestinais (Riley, 2020). As infeções por esta bactéria estão-se a tornar um desafio à saúde pública devido às suas resistências. Este microrganismo atua como dador e recetor de genes de resistência, ou seja, pode adquirir genes de resistência de outras bactérias e ainda transmitir os seus genes de resistência a outras bactérias por transferência horizontal de genes o que torna algumas estirpes de *E. coli* resistentes a quase todos os antimicrobianos clinicamente relevantes (Poirel *et al.*, 2018). Os principais mecanismos de resistência deste microrganismo são a aquisição de genes que codificam as β - lactamases de largo espetro (resistências às cefalosporinas de largo espetro), carbapenemases, genes 16S rRNA metilases (resistência aos aminoglicosídeos) e ainda genes de resistência a quinolonas mediadas por plasmídeos (resistência às fluoroquinolonas) (Poirel *et al.*, 2018).

Staphylococcus aureus é um coco de Gram-positivo e o responsável por infeções particularmente problemáticas maioritariamente devido à sua resistência aos antibióticos. É o principal microrganismo que causa pneumonias e infeções do trato respiratório, infeções cardiovasculares, infeções cutâneas e em casos mais graves pode mesmo ser fatal (Cheung *et al.*, 2021). Este microrganismo é comensal na mucosa nasal em 20-40% da população. *S. aureus* coloniza a pele e as mucosas, e quando estas barreiras são rompidas, seja devido a feridas, doenças, intervenções cirurgias (Lee *et al.*, 2018) (com uso de cateteres – devido à criação de biofilmes e ainda possíveis contaminações do material cirúrgico (Cheung *et al.*, 2021)) ou ainda quando o sistema imunológico está comprometido, pode causar infeção. As infeções mais problemáticas são causadas por *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) que muitas vezes também apresentam resistência

a outras classes de antibióticos, ou facilmente ganham essas resistências, o que torna o seu tratamento enigmático. MRSA é endêmico em quase todas as unidades de saúde em todo o mundo (Lee *et al.*, 2018), fazendo-se acompanhar de uma elevada taxa de mortalidade (Cheung *et al.*, 2021).

Os compostos fenólicos têm ação a nível da membrana celular dos microrganismos, acumulando-se na bicamada lipídica, o provoca desarranjos na estrutura e funções da membrana. Desta forma, podem penetrar na célula bacteriana e inibir atividades no citoplasma, provocando a lise e a libertação de ATP intracelular. Os compostos fenólicos permitem também aumentar a permeabilidade da membrana citoplasmática, o que leva à perda de constituintes celulares. Acredita-se que os principais responsáveis por conseguir romper a membrana celular bacteriana são os grupos hidroxilo (Mattos *et al.*, 2017).

1.2. Motivação

Este trabalho foi desenvolvido com o intuito de investigar os subprodutos vitivinícolas, nomeadamente o engaço e as grainhas, como fonte de compostos bioativos a serem utilizados como uma alternativa aos antimicrobianos convencionais para solucionar as várias resistências já comprovadas que existem a estes compostos. Atendendo à realidade atual é necessário que se encontrem respostas que envolvam um equilíbrio entre sustentabilidade e o problema das resistências dos microrganismos às terapêuticas existentes. Por estes mesmos fatores este projeto tem o propósito de potenciar os subprodutos vitivinícolas portugueses como recursos de compostos antimicrobianos passíveis de serem utilizados nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentar.

1.3. Objetivos

O objetivo principal deste projeto foi investigação de dois subprodutos resultantes da produção de vinho, o engaço e grainha, das castas Touriga Nacional e Touriga Franca, potenciando o interesse antioxidante e antimicrobiano dos seus componentes.

Para conseguir cumprir o objetivo principal, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Estimar os teores de compostos fenólicos e flavonoides totais, bem como atividade antioxidante dos extratos obtidos.
- Avaliar a capacidade antibacteriana dos extratos de engaços e grainhas contra bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, tendo-se escolhido como representantes destes microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respetivamente.
- Avaliar a capacidade antifúngica dos extratos de engaços e grainhas contra *Candida albicans* e *Candida krusei*

II. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

Para a realização deste estudo foram usados extratos de grainhas e de engaços de duas castas, a Touriga Nacional e a Touriga Franca. As grainhas e os engaços foram recolhidos em outubro de 2021, nos lagares da Sociedade Agrícola Trigo de Negreiros Lda, Bragança, Portugal. Foi recolhida uma amostra significativa, de aproximadamente 10 Kg de grainhas e outra amostra de igual quantidade de engaço. As grainhas e os engaços foram secos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após se confirmar a desidratação, < 10% humidade, procedeu-se à trituração total das grainhas e dos engaços, separadamente, com a ajuda de um moinho (GM GrinDomix 200, Retsch, Alemanha) durante 120 segundos a 5000 rpm (rotações por minuto) para se obter um pó fino. Estes foram posteriormente armazenados em frascos hermeticamente fechados, ao abrigo da luz.

2.2. Reagentes e Padrões

Os solventes usados na preparação dos extratos de grainhas e de engaços foram etanol absoluto, adquirido na Fisher Chemical. (Loughborough, Inglaterra), e água pura. Na determinação do teor de fenólicos totais foram usados o reagente Folin-Ciocalteu, adquirido na Merck KGaA (Darmstadt, Germany), carbonato de sódio (Na_2CO_3) e ácido gálgico ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$), comprados na Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA). Para a quantificação dos flavonoides totais, usaram-se nitrito de sódio (NaNO_2) e catequina ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$), ambos adquiridos na Sigma Chemical Co. St Louis, EUA), hidróxido de sódio (NaOH) proveniente da VWR International (Leuven, Bélgica) e ainda cloreto de alumínio (AlCl_3) adquirido na Panreac (Barcelona, Espanha). O estudo da atividade antioxidante foi realizado por dois métodos colorimétricos, o da determinação da capacidade sequestradora de radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e o do poder antioxidante de redução do ião férrico (FRAP). O DPPH e o padrão Trolox foram adquiridos na Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA). Já no ensaio do FRAP foram usados sulfato ferroso (FeSO_4), solução tripiridiltriazina (TPTZ), acetato de sódio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$), cloreto férrico (FeCl_3) e ainda ácido acético glacial (CH_3COOH), adquiridos na Sigma

Chemical Co. (St. Louis, EUA). Todos os reagentes utilizados tinham grau de pureza analítica.

Para a ressuspensão dos extratos secos usou-se dimetilsulfóxido (DMSO) adquirido na Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

Para a avaliação da atividade antifúngica, através do método de microdiluição, usou-se meio de Sabouraud dextrose Broth (SDB) adquirido na Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Já na avaliação da atividade antibacteriana por microdiluição, usou-se meio de Mueller-Hinton II Broth (MH II) adquirido na Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Para a preparação das suspensões de bactérias e leveduras utilizou-se soro fisiológico, preparado com cloreto de sódio (NaCl) adquirido na Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

Para a preparação do Sabouraud dextrose agar e do MHII agar usaram-se respetivamente o SDB e o MHII a que se adicionaram agar, proveniente da Liofilchem (Italy).

2.3. Preparação dos extratos

Para a preparação dos extratos das grainhas e dos engaços utilizaram-se 6,5 mg de cada uma das amostras pulverizadas em 100 mL de solvente extrator. O solvente ou mistura de solventes deve ter boa eficiência e afinidade química, de forma a proporcionar o maior rendimento possível na extração dos analitos das amostras. Como tal, neste estudo, usaram-se água pura, etanol e uma solução de etanol:água (50:50 v/v), como solventes extratores.

Todas as amostras foram submetidas a um processo de extração sólido/líquido durante uma hora, a 45°C, numa placa de aquecimento (Mirak, Thermolyse, EUA), sob agitação constante de 600 rpm (Costa *et al.*, 2014a). Seguidamente filtraram-se todos os extratos com a ajuda de papel de filtro Whatman No. 1, recolhendo-se 10 mL de cada extrato, que foram armazenados a -20°C, até serem usados. Com estes extratos procedeu-se à determinação dos compostos fenólicos totais (TPC) e de flavonoides totais (TFC) e ainda à avaliação da atividade antioxidante, através de dois métodos colorimétricos anteriormente referidos (inibição do radical DPPH e redução do ião férrico (FRAP)). Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

2.4. Teor de fenólicos totais

A determinação do TPC seguiu a metodologia espectrofotométrica descrita por (Costa *et al.*, 2018), usando o reagente de Folin-Ciocalteu. A 30 μL de extrato, adicionaram-se 150 μL da solução de reagente de Folin-Ciocalteu 1:10 v/v e 120 μL de solução de carbonato de sódio (7,5%), homogeneizando tudo no final. Incubou-se, de seguida, a solução resultante a 45°C, diretamente no leitor de microplacas Synergy HT (BioTek Instruments, Synergy HT GENS5, EUA), durante 15 minutos e ao abrigo da luz. Procedeu-se então à leitura das absorvências a 765nm. Como padrão usou-se o ácido gálgico.

Para se obter a correlação entre a absorvência das amostras e a concentração do padrão efetuou-se uma curva de calibração, ($y = 0,0082x + 0,0049$; $r^2 = 0,9991$). Os valores obtidos no estudo foram quantificados em miligramas de equivalentes de ácido gálgico por 100 gramas de extrato seco (mg EAG/ 100 g de extrato seco) (Vinha *et al.*, 2022)

2.5. Teor de flavonoides totais

Para a determinação deste parâmetro recorreu-se a um ensaio colorimétrico que envolve a formação de complexo flavonoide-alumínio, a 510 nm. A cada 30 μL de cada extrato, adicionaram-se 75 μL de água destilada e ainda 45 μL de solução de nitrito de sódio a 1%. Deixou-se a mistura reagir durante 5 minutos e, após este tempo, adicionou-se 45 μL de uma solução de cloreto de alumínio a 5%. Posteriormente adicionou-se 60 μL de hidróxido de sódio (1M) e ainda 45 μL de água destilada. Como padrão usou-se a catequina. Para a leitura das absorvências utilizou-se um leitor de microplacas.

Utilizaram-se diferentes concentrações de catequina para ser possível obter uma curva de calibração ($y = 0,0024x + 0,0059$; $r^2 = 0,9994$). Os resultados foram apresentados como a quantidade de flavonoide encontrada no extrato, expressa em termos de miligramas de equivalentes de catequina por cada 100 gramas de extrato seco (mg EC/ 100 g de extrato seco).

2.6. Atividade antioxidante

Devido à complexidade química das matrizes vegetais, não há um método analítico específico amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante. No entanto, neste estudo, foram utilizados dois métodos colorimétricos: o método DPPH e o método FRAP.

2.6.1. Método DPPH

A capacidade de eliminação de radicais livres (DPPH•) foi avaliada utilizando o método descrito por (Costa *et al.*, 2014a) com algumas alterações. Preparou-se inicialmente uma solução de DPPH• 6×10^{-5} M, que foi utilizada no próprio dia. Seguidamente adicionaram-se 270 μ L desta solução a 30 μ L de padrão Trolox/ branco/ extrato diluído (1:10). Posteriormente foi medida a diminuição da concentração de DPPH• num leitor de microplacas (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA), em intervalos de 10 minutos, monitorizando a diminuição da correspondente absorvência a 515 nm, com o objetivo de se obter uma cinética de reação. O final da reação ocorreu ao final de 20 minutos.

Foi ainda preparada uma curva de calibração com Trolox, sendo esta ($y = 0,0067x + 0,5496$; $r^2 = 0,9972$). A atividade de eliminação do radical DPPH• foi quantificada e expressa em micromoles de equivalentes de Trolox por 100 gramas de amostra seca (μ mol ET/ 100 g de amostra seca).

2.6.2. Método FRAP

Este estudo foi realizado com base no trabalho de (Costa *et al.*, 2018), com pequenas modificações. Misturaram-se 265 μ L do reagente FRAP (tampão acetato 0,3M, solução TPTZ 10 mM e cloreto férrico 20 mM) com 35 μ L de padrão de sulfato ferroso (5-600 μ M) / branco/ extratos diluídos (1:10). Seguidamente manteve-se a mistura anterior a 37°C, durante 30 minutos, e ao abrigo da luz. Posteriormente procedeu-se à leitura das absorvências a 595nm num leitor de microplacas (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA).

Preparou-se uma curva de calibração com sulfato ferroso ($y = 0,002x + 0,0022$; $r^2 = 0,9998$). O poder antioxidante foi quantificado e expresso em micromoles de equivalentes de sulfato ferroso por 100 gramas de amostra seca ($\mu\text{mol ESF}/ 100 \text{ g}$ de amostra seca).

2.7. Microrganismos

Neste estudo foram usados 4 espécies diferentes, duas leveduras e duas bactérias. Foram escolhidas para o estudo *Candida albicans* ATCC10231 e *Candida krusei* ATCC6258 para leveduras e para bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC29213 como representante de bactérias Gram-positivo e *Escherichia coli* ATCC25922 como representante de bactérias Gram-negativo.

2.8. Preparação das suspensões dos extratos secos

Para a determinação da atividade antimicrobiana, primeiramente faz-se uma ressuspensão dos extratos secos em DMSO, em ambiente estéril, à chama. São depois guardados no congelador a -20°C .

2.9. Avaliação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos extratos pela técnica de microdiluição

Esta técnica é uma técnica de microdiluição usada para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos contra os vários microrganismos em estudo. Este ensaio permite usar os extratos em estudo em diferentes concentrações. Isto permite perceber qual é a concentração mínima inibitória de cada extrato em cada microrganismo.

A concentração mínima inibitória (CMI) é a concentração mínima necessária para inibir o crescimento dos microrganismos totalmente, por avaliação visual (Moreira *et al.*, 2018; Cerqueira *et al.*, 2021).

2.9.1. Avaliação da atividade antifúngica dos extratos

Na câmara de fluxo laminar, faz-se a preparação das placas de 96 poços. Inicialmente coloca-se 192 microlitros de meio SDB nos poços da linha A. Depois 100 microlitros do mesmo meio nas linhas de B a G. A linha H é o controlo positivo e negativo, por isso esta dividida a meio, os primeiros 6 poços é o controlo positivo e então adicionamos 100 microlitros de meio. Nos outros 6 poços é o controlo negativo, então adiciona-se 200 microlitros de meio, (assim podemos verificar se há ou não alguma contaminação do meio). Posteriormente adiciona-se 8 microlitros de extrato em cada poço da linha A (cada poço tem um extrato diferente).

Seguidamente retira-se 100 microlitros do primeiro poço e passa-se para o poço seguinte, faz-se a homogeneização e depois volta-se a repetir o processo em todos os poços até ao poço G. Neste último, em vez de se adicionar ao poço seguinte, rejeitam-se os 100 microlitros. Desta maneira estamos a fazer a diluição dos compostos em diferentes concentrações, sendo que a do primeiro poço tem uma concentração de 200 µg/ml, como podemos ver na Figura 5.

Depois é necessário fazer a preparação da suspensão de leveduras. Para isto, em técnica asséptica à chama, usamos soro fisiológico esterilizado e uma parte da colónia do microrganismo em estudo até se obter uma densidade ótica de 0,5 Mc Farland. Desta suspensão retira-se 20 microlitros para um eppendorf estéril e acrescenta-se 980 microlitros de meio. Seguidamente retira-se 0,5 ml da suspensão anterior para um tubo de falcon e acrescenta-se 9,5 ml de meio. E esta é a nossa suspensão de trabalho.

Depois da suspensão de leveduras estar pronta, ainda à chama, adiciona-se 100 microlitros desta suspensão em todos os poços das linhas A a G e ainda nos primeiros 6 poços da linha H (H1 a H6). Deixa-se a incubar 48 horas na estufa a 35° C.

Após a incubação analisa-se qual a concentração mínima inibitória para cada extrato, ou seja, qual a concentração mais baixa à qual não se verificou visualmente crescimento de microrganismos.

2.9.2. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos

Para a diluição dos compostos procedeu-se da mesma forma que já descrito para as leveduras, substituindo-se o SDB pelo MHB II. A leitura da CMI foi realizada ao fim de 24 horas de incubação.

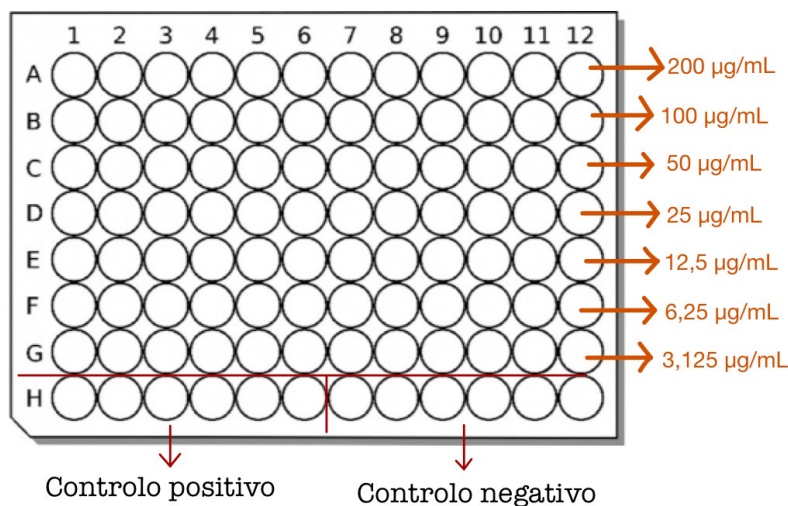


Figura 5: Esquema das placas de 96 poços

2.10. Concentração mínima letal (CML)

Para a avaliação da concentração mínima letal usamos placas com diferentes meios consoante as amostras.

Inicialmente fez-se uma divisão da parte de fora de cada placa com um marcador para facilitar o processo. Usamos placas de Sabouraud dextrose agar no caso de leveduras e placas com Mueller-Hinton II agar no caso das bactérias. Em cada divisão feita adicionamos 10 µL, do poço correspondente à concentração máxima em estudo, 200 µg/mL (Figura 6). Posteriormente colocou-se na estufa a incubar a 35°C durante 24 horas.

Após a incubação avaliamos se houve crescimento dos microrganismos, permitindo-nos perceber de estes estavam inibidos pelos extratos ou se foram mortos pelos extratos. A Concentração mínima letal é a concentração mais baixa que reduz em 99,9% dos microrganismos iniciais, ou seja, a concentração mais baixa que provoca a morte dos

microrganismos (Moreira, M. M. et al. (2018)). Este ensaio permite perceber se na concentração máxima em estudo os extratos apenas inibem o crescimento dos microrganismos – fungistático/ bacteriostático – ou se levam à sua morte – fungicida/ bactericida.

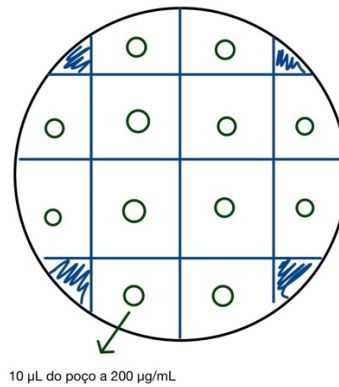


Figura 6: Esquema das placas para avaliação da concentração mínima letal

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Teores de compostos fenólicos e flavonoides totais das grainhas e engaços

Tal como se pode ver pela observação da tabela 1, relativamente à determinação dos teores de fenólicos totais (TPC) e de flavonoides totais (TFC) dos extratos das grainhas das duas castas estudadas, Touriga Nacional e Touriga Franca, o etanol é o solvente com maior poder extrator, seguido da solução de etanol:água (50:50 v/v). De acordo com a tabela 2, verifica-se o mesmo padrão de comportamento para os extratos dos engaços das castas anteriormente referidas. A água é o solvente que apresenta um menor poder extrator em todos os ensaios realizados.

Comparando os valores de TPC e de TFC das grainhas das duas castas em estudo (tabela 1), os extratos de Touriga Nacional apresentam valores superiores com qualquer um dos solventes, sendo o extrato etanólico aquele em que o valor mais difere entre as duas castas.

Já outros estudos foram feitos no que diz respeito à quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides de grainhas em outras castas tintas, como por exemplo, Pinot Noir, Negro Amaro, Average, Cabernet Sauvignon (Rockenbach *et al.*, 2011), Marselan (Krasteva *et al.*, 2023), entre outras, sendo que os valores destes compostos variam muito entre si (Rockenbach *et al.*, 2011). Por exemplo, estudos realizados por Krasteva *et al.* (2023) mostraram que os extratos de grainhas da casta Cabernet Sauvignon, trituradas a pó, numa solução aquosa de etanol a 70%, tinham valores de TPC de $88,22 \pm 0,72$ mg EAG/ g de extrato seco. Já para a casta Marselan, os valores de TPC foram de $103,24 \pm 1,28$ mg EAG/ g de extrato seco e para Pinot Noir de $79,06 \pm 0,65$ mg EAG/ g de extrato seco. No caso dos TFC, os valores variaram entre $45,95 \pm 0,14$ mg EC/ g de extrato seco (Cabernet Sauvignon) e $52,01 \pm 0,34$ mg EC/ g de extrato seco (Marselan), inferiores aos respetivos valores de TPC, o que está de acordo com os nossos resultados, exceto para o extrato aquoso de Touriga Nacional. No entanto, tendo em conta que as castas e o modo de extração são diferentes dos usados no âmbito do nosso trabalho, não é possível fazer uma comparação direta com os resultados por nós obtidos.

Tabela 1: Teor de compostos fenólicos e flavonoides e capacidade antioxidante das grainhas das castas estudadas

Casta	Solvente extrator	TPC (mg EAG /100 g)	TFC (mg EC /100 g)	DPPH (μ mol ET/ 100 g)	FRAP (μ mol ESF / 100 g)
Touriga Franca	Água	61,27 \pm 0,65	37,11 \pm 1,44	974,8 \pm 1,20	2037,68 \pm 1,15
	Etanol	210,78 \pm 0,37	70,32 \pm 1,14	2096,33 \pm 0,51	3756,75 \pm 10,03
	Hidroalcoólico	187,61 \pm 1,44	61,43 \pm 0,96	1749,81 \pm 1,07	3019 \pm 1,00
Touriga Nacional	Água	74,80 \pm 1,02	93,86 \pm 1,01	1041,67 \pm 1,42	2984,70 \pm 0,34
	Etanol	393,07 \pm 1,76	195,03 \pm 6,37	3323,63 \pm 3,45	3780,91 \pm 1,58
	Hidroalcoólico	264,44 \pm 4,43	101,98 \pm 1,10	2791,53 \pm 1,05	3064,69 \pm 0,62

Valores apresentados em média \pm desvio padrão (n=3).

Relativamente aos extratos dos engaços (tabela 2), a Touriga Franca apresenta valores mais elevados de TPC que a Touriga Nacional, com qualquer um dos solventes extratores usados, sendo que a diferença mais significativa entre as castas acontece quando o solvente extrator é a mistura hidroalcoólica. No ensaio do TFC, o comportamento é diferente do observado para o TPC, exibindo os extratos da Touriga Nacional valores maiores de concentração destes compostos com qualquer solvente, com o extrato aquoso a ser aquele em que a diferença entre as duas castas é menor, seguido do extrato hidroalcoólico e do extrato etanólico.

Tabela 2: Teor de compostos fenólicos e flavonoides e capacidade antioxidante dos engaços das castas estudadas

Casta	Solvente extrator	TPC (mg EAG /100 g)	TFC (mg EC /100 g)	DPPH (μ mol ET/ 100 g)	FRAP (μ mol ESF / 100 g)
Touriga Franca	Água	4306,44 \pm 328,10	969,80 \pm 117,98	2603,06 \pm 140,24	40991,59 \pm 3633,16
	Etanol	58115,75 \pm 563,90	2051,92 \pm 107,87	4329,79 \pm 412,86	62633,65 \pm 4390,58
	Hidroalcoólico	14184,65 \pm 749,83	311,26 \pm 28,03	930,58 \pm 85,68	954,04 \pm 203,53
Touriga Nacional	Água	2885,08 \pm 209,31	1144,81 \pm 26,36	2824,53 \pm 376,72	38842,26 \pm 4356,80
	Etanol	5528,01 \pm 447,51	2753,03 \pm 214,02	4842,47 \pm 562,65	68822,75 \pm 5178,16
	Hidroalcoólico	3943,79 \pm 328,31	850,40 \pm 33,34	1279,88 \pm 172,55	11470,41 \pm 1927,57

Valores apresentados em média \pm desvio padrão (n=3).

Blackford *et al.* (2021) compilaram valores dos teores de compostos fenólicos de extratos de engaços de várias castas, nomeadamente da Cabernet Sauvignon, Manto Negro, Mandilaria, Tempranillo, entre outras. De acordo com este artigo de revisão, por exemplo, os valores de TPC para a casta Cabernet Sauvignon variaram entre 348 e 7076 mg EAG /100 g de extrato seco; para a Mandilaria, entre 1057 e 1434,3 mg EAG /100 g de extrato seco; e para a Tempranillo entre 4679 e 7622 mg EAG /100 g de extrato seco, dependendo do ano de colheita. Para além do ano de colheita das uvas, muito dependente de fatores

climáticos, a sua composição em compostos fenólicos, depende das condições e práticas de cultivo, localização geográfica e estágio de maturação (Leal *et al.*, 2020b; Simonetti *et al.*, 2020), o que se reflete também na composição dos subprodutos. À semelhança do referido anteriormente para as grainhas, não é possível fazer uma comparação direta com os resultados por nós obtidos.

O processo de extração das grainhas e dos engaços é, em muito, influenciado pelo solvente utilizado nesse processo, o que condiciona a concentração dos compostos fenólicos determinada (Vázquez-Armenta *et al.*, 2017). De facto, vários estudos já demonstraram o quanto a escolha do solvente influencia os resultados obtidos (Barros *et al.*, 2014; Trošt *et al.*, 2016; Leal *et al.*, 2020a). Em diversos estudos, a escolha do solvente recai sobre o metanol, mas este apresenta algumas desvantagens por ser tóxico, assim como responsável por provocar acidose e danos na retina (Joshi *et al.*, 2019). Por este motivo, este solvente não era uma opção para este trabalho, uma vez que aplicações potenciadas por estes extratos são no âmbito das indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética. A opção era a utilização de solventes não tóxicos, mesmo que isso pudesse ter consequências a nível da eficácia do processo de extração dos compostos e, da consequente determinação dos mesmos.

Outro aspeto a considerar é que cada variedade de castas e cada parte específica da videira apresentam uma diferente composição, e devido à polaridade e afinidade dos compostos presentes em cada uma delas, a extração destes compostos não segue o mesmo padrão, mesmo quando os solventes utilizados no processo de extração são os mesmos (Simonetti *et al.*, 2020).

3.2. Capacidade antioxidante de grainhas e engaços

O processo de respiração e, de uma forma geral, todas as reações oxidativas que ocorrem nas células e usam oxigénio levam à formação de radicais livres, que são moléculas ou iões instáveis e podem causar danos celulares e, consequentemente, serem nocivos para o organismo. Danos esses que estão associados a vários problemas de saúde, como inflamações, tumores, doença de alzheimer e doenças cardiovasculares. Os antioxidantes que estão presentes nas plantas conseguem atuar como agentes redutores e sequestradores destes radicais livres, assim como inibidores de enzimas e como quelantes de metais. Os

principais antioxidantes que estão presentes nos vegetais são compostos fenólicos, em especial os flavonoides, e ainda as vitaminas C e E e os carotenoides (Boeira Cataneo *et al.*, 2008; Lordêlo Cardoso Silva *et al.*, 2010).

No que toca à atividade antioxidante, tanto dos extratos das grainhas (tabela 1) como dos engaços (tabela 2), determinada pelo ensaio do DPPH, a Touriga Nacional apresenta valores mais elevados em qualquer dos solventes, sendo o extrato etanólico e o extrato hidroalcoólico os que evidenciam diferenças mais significativas entre as duas castas.

A capacidade antioxidante dos extratos das grainhas da Touriga Nacional, determinada pelo método FRAP, é mais elevada comparativamente aos da Touriga Franca, com qualquer um dos solventes usados. O mesmo comportamento foi também verificado para os extratos dos engaços em etanol e na mistura hidroalcoólica. No caso das grainhas, a diferença dos valores em etanol e na mistura hidroalcoólica entre as duas castas não é considerável, apresentando, no entanto, o extrato aquoso uma diferença significativa. Para os extratos dos engaços, a diferença mais significativa entre os valores de FRAP aconteceu para a mistura hidroalcoólica.

Comparando os extratos das grainhas (tabela 1) com os do engaço (tabela 2) da Touriga Franca, pode-se concluir que a atividade antioxidante, determinada pelos dois métodos usados (DPPH e FRAP), é maior para o engaço quando o solvente extrator é água ou o etanol, mas superior para as grainhas quando se utilizou a solução etanol:água (50:50 v/v). No caso da Touriga Nacional, a capacidade antioxidante é, em geral, maior para o engaço do que para as grainhas, pelos dois métodos usados, exceto para o DPPH quando o solvente extrator é a mistura hidroalcoólica.

A atividade antioxidante está relacionada com o teor de polifenóis, ou seja, quanto maior a concentração destes compostos maior é a atividade antioxidante (Leal *et al.*, 2020b). No presente estudo verifica-se essa correlação nos extratos das grainhas, independentemente da casta e do solvente usado. Quanto aos extratos de engaço este padrão de comportamento não se verifica para o solvente hidroalcoólico, mas a quantidade de flavonoides parece ter uma maior influência na atividade antioxidante, comparando entre si todos os resultados da tabela 2.

No estudo realizado por Blackford *et al.* (2021) também se determinou a atividade antioxidante de extratos de engaços de Touriga Nacional e de Touriga Franca, entre outros, pelo método de FRAP. A Touriga Nacional apresentou valores de 257,8 mg ET/g de extrato seco, já a Touriga Franca obteve 30 mM ET/ 100 g de extrato seco. Uma vez que as condições de extração e de quantificação são diferentes das do nosso estudo, não é possível realizar uma comparação entre os resultados.

De facto, no caso da atividade antioxidante, não existe um método analítico específico amplamente utilizado para a sua avaliação. No entanto, existem vários estudos da determinação da atividade antioxidante de extratos de engaços e de grainhas de diferentes castas tintas, tais como Pinot Noir, Negro Amaro, Average, Castelão, Tinto Cão, entre outras (Rockenbach *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2014b; Blackford *et al.*, 2021; Krasteva *et al.*, 2023).

De acordo com Rockenbach *et al.* (2011) foi avaliada a atividade antioxidante de extratos de grainhas de várias castas, usando como solvente extrator uma mistura de metanol/ água/ ácido acético (80:20:5), pelos métodos de DPPH e FRAP. Para o ensaio do DPPH, por exemplo, a casta Pinot Noir teve valores de 16925 ± 189 $\mu\text{mol ET/ 100 g}$ de extrato seco; o Negro Amaro apresentou valores de 7265 ± 95 $\mu\text{mol ET/ 100 g}$ de extrato seco; e a Average de 8517 $\mu\text{mol ET/ 100 g}$ de extrato seco. Já para o ensaio do FRAP, a casta Pinot Noir apresenta valores de 21492 ± 47 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/ 100 \text{ g}$ de extrato seco, a Negro Amaro de 9447 ± 49 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/ 100 \text{ g}$ de extrato seco e a Average 10729 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/ 100 \text{ g}$ de extrato seco. Os valores obtidos pelo método de FRAP são superiores aos do DPPH, o que também se verifica no nosso estudo. Tal já era expectável, uma vez que o DPPH é um método colorimétrico sujeito a diversas interferências.

Krasteva *et al.* (2023) também avaliaram a atividade antioxidante de extratos de grainhas da casta Pinot Noir, pelo método de DPPH, usando como solvente extrator uma solução aquosa de etanol a 70%, e obtiveram $579,33 \pm 4,15$ $\mu\text{M ET/ g}$ de extrato seco.

3.3. Avaliação da atividade dos extratos de grainhas e engaços como antifúngicos

Para este ensaio usou-se a técnica de microdiluição em que a concentração máxima dos extratos testada foi de 200 µg/mL em duas leveduras do género *Candida* diferentes.

Começando por *C. krusei*, o extrato de grainhas de Touriga Franca apenas demonstrou alguma atividade com o solvente hidroalcoólico, sendo que com os outros dois solventes utilizados no estudo não houve inibição nenhuma à concentração máxima em estudo. No caso do extrato de grainha de Touriga Nacional o mesmo se repete, apenas o extrato preparado com o solvente hidroalcoólico mostrou alguma atividade. Comparando a atividade das duas castas em estudo, os resultados não apresentam uma diferença muito significativa, dados os valores do desvio padrão. (Tabela 3).

Dados os resultados dos ensaios anteriores, nos extratos de grainhas de Touriga Franca seria de esperar que o extrato com uma maior atividade fosse o etanólico e não o hidroalcoólico (como se verificou), tendo em conta que é o que apresenta um teor mais elevado de compostos fenólicos e flavonoides. O mesmo acontece nos extratos de grainhas de Touriga Nacional.

Outro aspeto que seria de esperar e que realmente de verificou é que a Touriga Nacional tivesse uma maior atividade que a Touriga Franca, visto que, entre as duas castas apresenta valores mais elevados de compostos fenólicos e flavonoides, independentemente do solvente utilizado na extração.

Tabela 3: Concentrações mínimas inibitórias dos extratos de grainhas em *C. krusei*

<i>C. krusei</i>		
Casta	Extrato	CMI (µg/mL)
Touriga Franca	Aquoso	>200,00
	Etanólico	>200,00
	Hidroalcoólico	17,50 ± 6,85
Touriga Nacional	Aquoso	>200,00
	Etanólico	>200,00
	Hidroalcoólico	8,75 ± 3,42

Valores apresentados em média ± desvio padrão (n = 3 – 5).

Já nos extratos de engaços de Touriga Franca, nenhum dos extratos preparados com os diferentes solventes mostrou atividade à máxima concentração em estudo. No caso do extrato de engaço de Touriga Nacional o mesmo se repete. Não sendo assim possível estabelecer uma comparação da atividade entre as duas castas em estudo (Tabela 4).

Dados os resultados dos ensaios anteriores, nos extratos de engaço de Touriga Franca seria de esperar que o extrato etanólico tivesse uma maior atividade e não que nenhum dos extratos tivesse atividade, tendo em conta que este é o que apresenta um teor mais elevado de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante. O mesmo acontece nos extratos de engaços de Touriga Nacional.

Outro aspeto que seria de esperar e que não se verificou é que a Touriga Nacional tivesse uma maior atividade que a Touriga Franca, visto que, entre as duas castas apresenta valores mais elevados de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante, independentemente do solvente usado.

Tabela 4: Concentrações mínimas inibitórias dos extratos dos engaços em *C. krusei*

<i>C. krusei</i>		
Casta	Extrato	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
Touriga Franca	Aquoso	>200,00
	Etanólico	>200,00
	Hidroalcoólico	>200,00
Touriga Nacional	Aquoso	>200,00
	Etanólico	>200,00
	Hidroalcoólico	>200,00

Valores apresentados em média \pm desvio padrão (n=3).

Comparando agora a atividade entre os extratos de grainhas e engaços, seria de esperar que os extratos de engaços de qualquer uma das castas apresentasse uma maior atividade que os extratos de grainhas de qualquer uma das castas, dado os resultados das Tabelas 1 e 2. Mas o mesmo não se verificou, visto que, quer na Touriga Franca, quer na Touriga Nacional com um dos solventes extratores usados, hidroalcoólico, os extratos de grainha apresentaram uma maior atividade que os extratos de engaço. Já com os restantes

solventes extratores, em qualquer um dos extratos (grainhas e engaços), até à concentração máxima em estudo, nenhum apresentou atividade.

Em *C. albicans*, o extrato de grainhas de Touriga Franca não apresentou nenhuma atividade independentemente do solvente utilizado para fazer a extração, mesmo à concentração máxima estudada. Já o extrato de Touriga Nacional demonstrou alguma atividade quando preparado recorrendo ao solvente hidroalcoólico, ainda que bastante baixa quando comparada com os resultados em *C. krusei*. Com os outros dois solventes utilizados no estudo não se verificou nenhuma atividade, mesmo à concentração máxima (Tabela 5).

Dados os resultados dos ensaios anteriores, nos extratos de grainhas de Touriga Franca seria de esperar que o extrato com uma maior atividade fosse o etanólico e não o hidroalcoólico (como se verificou, ainda que, só numa das castas), tendo em conta que é o que apresenta um teor mais elevado de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante. O mesmo acontece nos extratos de grainhas de Touriga Nacional (Tabela 5).

Outro aspeto que seria de esperar e que efetivamente se verificou é que os extratos de Touriga Nacional tivessem uma maior atividade que os extratos de Touriga Franca, visto que, entre as duas castas apresentam valores mais elevados de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante, independentemente do solvente em estudo (Tabela 5).

Tabela 5: Concentrações mínimas inibitórias dos extratos de grainhas em *C. albicans*

<i>C. albicans</i>		
Casta	Extrato	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
Touriga Franca	Aquoso	>200,00
	Etanólico	>200,00
	Hidroalcoólico	>200,00
Touriga Nacional	Aquoso	>200,00
	Etanólico	>200,00
	Hidroalcoólico	100,00 \pm 0,00

Valores apresentados em média \pm desvio padrão (n = 3 – 5).

Já nos extratos de engaços de Touriga Franca, nenhum dos extratos mostrou atividade à máxima concentração em estudo. No caso dos extratos de engaços de Touriga Nacional o mesmo se repete. Não sendo assim possível estabelecer uma comparação da atividade entre as duas castas em estudo (Tabela 6).

Dados os resultados dos ensaios anteriores, nos extratos de engaços de Touriga Franca seria de esperar que o extrato com uma maior atividade fosse o etanólico e não que nenhum dos extratos tivesse atividade, tendo em conta que é o extrato que apresenta um teor mais elevado de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante. O mesmo acontece nos extratos de engaços de Touriga Nacional (Tabela 6).

Outro aspeto que seria de esperar e que não se verificou é que os extratos de Touriga Nacional tivessem uma maior atividade que os extratos da Touriga Franca, visto que, entre as duas castas apresenta valores mais elevados de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante, independentemente do solvente em estudo (Tabela 6).

Tabela 6: Concentrações mínimas inibitórias dos extratos dos engaços em *C. albicans*

<i>C. albicans</i>		
Casta	Extrato	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
Touriga Franca	Aquoso	>200,00
	Etanólico	>200,00
	Hidroalcoólico	>200,00
Touriga Nacional	Aquoso	>200,00
	Etanólico	>200,00
	Hidroalcoólico	>200,00

Valores apresentados em média \pm desvio padrão (n=3).

Comparando agora a atividade entre os extratos de grainhas e engaços, seria de esperar que os extratos de engaços de qualquer uma das castas apresentasse uma maior atividade que os extratos de grainhas de qualquer uma das castas, dado os resultados das Tabelas 1 e 2. Mas o mesmo não se verificou, visto que, nos extratos de Touriga Nacional com um dos solventes extratores utilizados, hidroalcoólico, os extratos de grainha apresentaram uma maior atividade que os extratos de engaço. Já com os restantes solventes extratores

utilizados, em qualquer um dos extratos (grainhas e engaços), até à concentração máxima em estudo, nenhum extrato apresentou atividade.

No estudo desenvolvido por (Oliveira *et al.*, 2013) foram avaliadas as CMI a diferentes temperaturas e pressões de duas castas, sendo que para o estudo em *C. albicans* e *C. krusei* apenas foi usada uma delas, a Merlot. Este estudo mostrou, para esta determinada casta que, com o aumento da temperatura e a diminuição da pressão durante o processo de extração, a capacidade inibitória torna-se mais fraca.

3.3. Avaliação da atividade dos extratos de grainhas e engaços como antibacterianos

A ação bactericida dos compostos fenólicos presentes deve-se a diferentes fatores, tais como, a interação dos compostos com enzimas e substratos, alterações na morfologia celular, e no conteúdo de DNA, entre outros (Leal *et al.*, 2020b).

Para este ensaio usou-se a técnica de microdiluição em que a concentração máxima testada foi de 200 µg/mL e duas bactérias diferentes.

Começando por *S. aureus*, o extrato de grainha de Touriga Franca que apresentou alguma atividade, ainda que pouca, foi o extrato hidroalcoólico, sendo que com os outros dois solventes extratores em estudo não se verificou nenhuma inibição à concentração máxima. No caso dos extratos de Touriga Nacional, apenas o extrato hidroalcoólico apresentou atividade, uma vez que o extrato aquoso e etanólico não mostraram atividade mesmo à concentração máxima em estudo (Tabela 7).

Comparando a atividade das duas castas contra o mesmo microrganismo, nota-se uma diferença significativa de resultados, sendo que os extratos de Touriga Nacional apresentam um resultado de inibição bastante superior aos extratos de Touriga Franca (Tabela7).

Dados os resultados dos ensaios anteriores, nos extratos de grainhas de Touriga Franca seria de esperar que o extrato com uma maior atividade fosse o etanólico e não o hidroalcoólico (como se verificou), tendo em conta que é o que apresenta um teor mais

elevado de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante. O mesmo acontece nos extratos de grainhas de Touriga Nacional (Tabela 7).

Outro aspeto que seria de esperar e que realmente se verificou é que os extratos de Touriga Nacional tivessem uma maior atividade que os extratos de Touriga Franca, visto que, entre as duas castas apresenta valores mais elevados de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante, independentemente do solvente em estudo (Tabela 7).

Tabela 7: Concentrações mínimas inibitórias dos extratos de grainhas em *S. aureus*

<i>S. aureus</i>		
Casta	Extrato	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
Touriga Franca	Aquoso	>200,00
	Etanólico	>200,00
	Hidroalcoólico	100,00 \pm 0,00
Touriga Nacional	Aquoso	>200,00
	Etanólico	>200,00
	Hidroalcoólico	40,00 \pm 13,69

Valores apresentados em média \pm desvio padrão (n = 3 – 5).

Já nos extratos de engaços de Touriga Franca, nenhum dos extratos mostrou atividade à máxima concentração em estudo. No caso dos extratos de engaços de Touriga Nacional o mesmo se repete. Não sendo assim possível estabelecer uma comparação da atividade entre as duas castas em estudo (Tabela 8).

Dados os resultados dos ensaios anteriores, nos extratos de engaço de Touriga Franca seria de esperar que o extrato com uma maior atividade fosse o etanólico e não que nenhum dos extratos apresentasse atividade, tendo em conta que é o extrato que apresenta um teor mais elevado de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante. O mesmo acontece nos extratos de engaços de Touriga Nacional (Tabela 8).

Outro aspeto que seria de esperar e que não se verificou é que os extratos de Touriga Nacional tivessem uma maior atividade que os da Touriga Franca, visto que, entre as duas castas apresenta valores mais elevados de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante, independentemente do solvente em estudo (Tabela 8).

Tabela 8: Concentrações mínimas inibitórias dos extratos dos engaços em *S. aureus*

<i>S. aureus</i>		
Casta	Extrato	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
Touriga Franca	Aquoso	>200,00
	Etanólico	>200,00
	Hidroalcoólico	>200,00
Touriga Nacional	Aquoso	>200,00
	Etanólico	>200,00
	Hidroalcoólico	>200,00

Valores apresentados em média \pm desvio padrão (n=3).

Comparando agora a atividade entre os extratos de grainhas e engaços, seria de esperar que os extratos de engaços de qualquer uma das castas apresentasse uma maior atividade que os extratos de grainhas de qualquer uma das castas, dado os resultados das Tabelas 1 e 2. Mas o mesmo não se verificou, visto que, quer nos extratos de Touriga Franca, quer nos da Touriga Nacional com um dos solventes extratores em estudo, hidroalcoólico, os extratos de grainha apresentaram uma maior atividade que os extratos de engaço. Já com os restantes solventes utilizados, em qualquer um dos extratos (grainhas e engaços), até à concentração máxima em estudo, nenhum apresentou atividade.

Em *E. coli*, quer nos extratos de grainhas, quer nos extratos de engaços, independentemente do solvente em estudo, nenhuma das duas castas apresentou atividade à concentração máxima em estudo (Tabela 9).

Dados os resultados dos ensaios anteriores, nos extratos de grainhas de Touriga Franca seria de esperar que o extrato com uma maior atividade fosse o etanólico, mas nenhum dos extratos mostrou qualquer atividade, tendo em conta que é o que apresenta um teor mais elevado de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante. O mesmo acontece nos extratos de grainhas de Touriga Nacional (Tabela 9).

Outro aspeto que seria de esperar e que não se verificou, é que os extratos de Touriga Nacional tivessem uma maior atividade que os da Touriga Franca, visto que, entre as duas castas apresenta valores mais elevados de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante, independentemente do solvente em estudo (Tabela 9).

Tabela 9: Concentrações mínimas inibitórias dos extratos de grainhas em *E. coli*

<i>E. coli</i>		
Casta	Extrato	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
Touriga Franca	Aquoso	>200,00
	Etanólico	>200,00
	Hidroalcoólico	>200,00
Touriga Nacional	Aquoso	>200,00
	Etanólico	>200,00
	Hidroalcoólico	>200,00

Valores apresentados em média \pm desvio padrão (n=3).

Já nos extratos de engaços de Touriga Franca, nenhum dos extratos mostrou atividade à máxima concentração em estudo. No caso dos extratos de engaços de Touriga Nacional o mesmo se repete. Não sendo assim possível estabelecer uma comparação da atividade entre as duas castas em estudo (Tabela 10).

Dados os resultados dos ensaios anteriores, nos extratos de engaço de Touriga Franca seria de esperar que o extrato com uma maior atividade fosse o etanólico e não que nenhum tivesse atividade, tendo em conta que é o que apresenta um teor mais elevado de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante. O mesmo acontece nos extratos de engaços de Touriga Nacional (Tabela 10).

Outro aspeto que seria de esperar e que não se verificou é que os extratos de Touriga Nacional tivessem uma maior atividade que os da Touriga Franca, visto que, entre as duas castas apresenta valores mais elevados de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante, independentemente do solvente em estudo (Tabela 10).

Tabela 10: Concentrações mínimas inibitórias dos extratos dos engaços em *E. coli*

<i>E. coli</i>		
Casta	Extrato	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
Touriga Franca	Aquoso	>200,00
	Etanólico	>200,00
	Hidroalcoólico	>200,00
Touriga Nacional	Aquoso	>200,00
	Etanólico	>200,00
	Hidroalcoólico	>200,00

Valores apresentados em média \pm desvio padrão (n=3).

Comparando agora a atividade entre os extratos de grainhas e engaços, seria de esperar que os extratos de engaços de qualquer uma das castas apresentasse uma maior atividade que os extratos de grainhas de qualquer uma das castas, dado os resultados das Tabelas 1 e 2. Mas o mesmo não se verificou, visto que, em qualquer um dos extratos (grainhas e engaços), até à concentração máxima em estudo, nenhum apresentou atividade.

No estudo desenvolvido por (Trošt *et al.*, 2016), foi avaliada a CMI de diferentes castas em diferentes microrganismos. No caso de *S. aureus* e *E. coli* foram usadas 3 castas diferentes com diferentes solventes e a diferentes concentrações. As castas neste estudo foram a Cabernet Sauvignon, Merlot e Pinot Noir. Os resultados mostraram uma maior inibição em *S. aureus* com todas as castas, do que em *E. coli*. O que, segundo os autores, está de acordo com os extratos fenólicos vegetais serem menos eficazes contra bactérias Gram-negativas, pelo facto de a parede destas bactérias ser revestida por uma membrana externa, que contém lipopolissacarídeos, o que dificulta a passagem de vários compostos, nomeadamente moléculas muito grandes. Esta é uma hipótese para os resultados obtidos neste trabalho.

3.4 Mecanismo de ação fungistático/ fungicida ou bacteriostático/ bactericida dos extratos de grainhas

Para *C. albicans*, na máxima concentração em estudo, quer a Touriga Franca, quer a Touriga Nacional apresentam um mecanismo de ação fungicida. No caso de *C. krusei*, na máxima concentração em estudo, quer a Touriga Franca, quer a Touriga Nacional apresentam um mecanismo de ação fungicida. E ainda no caso de *S. aureus*, na máxima concentração em estudo, quer a Touriga Franca, quer a Touriga Nacional apresentam um mecanismo de ação bactericida (Tabela 11).

Tabela 11: Mecanismo de ação fungistático/ fungicida ou bacteriostático/ bactericida dos extratos de grainhas a 200 µg/mL

Microrganismos	Casta – Extrato	Mecanismo de ação (200 µg/mL)
<i>C. albicans</i>	Touriga Franca – Extrato Hidroalcoólico	Fungicida
<i>C. albicans</i>	Touriga Nacional – Extrato Hidroalcoólico	Fungicida
<i>C.krusei</i>	Touriga Franca – Extrato Hidroalcoólico	Fungicida
<i>C. krusei</i>	Touriga Nacional – Extrato Hidroalcoólico	Fungicida
<i>S. aureus</i>	Touriga Franca – Extrato Hidroalcoólico	Bactericida
<i>S. aureus</i>	Touriga Nacional – Extrato Hidroalcoólico	Bactericida

IV. CONCLUSÃO

Os diferentes subprodutos da vinha já são utilizados e até consumidos há muitos anos. Muitos são os trabalhos de investigação que têm sido desenvolvidos na última década, que evidenciam atividades biológicas dos compostos existentes nos subprodutos da viticultura. Estes subprodutos são ricos em compostos bioativos, sendo que os benefícios destes advêm das suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, entre outras, relevantes na prevenção de algumas doenças. Destes compostos bioativos, destacam-se os flavonoides e os compostos fenólicos.

Dados os problemas ambientais que são vividos nos dias de hoje, o reaproveitamento de todos os subprodutos, como fonte de novas matérias primas, é fundamental. No caso em particular da viticultura, e dada a elevada quantidade de subprodutos produzidos anualmente, o seu reaproveitamento é de grande importância. Tendo uma composição rica em compostos bioativos, estes subprodutos podem ser utilizados para a criação de novos produtos, a nível das indústrias cosmética, farmacêutica e alimentar.

Esta dissertação foi desenvolvida com o intuito de investigar o potencial dos engaços e das grainhas das castas nacionais Touriga Nacional e Touriga Franca, nos setores anteriormente referidos, com o objetivo de os utilizar futuramente como antioxidantes e antimicrobianos. A pesquisa e a investigação de novas aplicações para estes subprodutos têm impacto positivo nas vertentes económica, ambiental e social da sustentabilidade, promovendo a economia circular.

Neste trabalho foi comprovada tanto a atividade antioxidante, como a antibacteriana e antifúngica dos vários extratos de grainhas. Já para os vários extratos de engaços, foi comprovada a atividade antioxidante, mas não a atividade antibacteriana e antifúngica. Os resultados obtidos foram condicionados pelo método de extração, nomeadamente pela escolha do solvente, que tem influência na concentração de compostos quantificados. Há, por exemplo, compostos que apresentem uma maior atividade biológica, mas devido à polaridade do solvente, podem não ser extraídos, ou ser extraídos em menores quantidades. Isto leva a outro ponto de interesse em analisar todos os constituintes dos polifenóis presentes nos extratos e testar a sua atividade para perceber quais seriam os constituintes mais ativos e com isso melhorar a escolha do solvente a utilizar. Todos estes aspetos vão influenciar os resultados finais.

É urgente que sejam tomadas medidas a nível da sociedade para evitar a propagação das resistências aos antimicrobianos, desde a redução iminente do uso de antimicrobianos à procura e investigação de novos compostos. O objetivo da utilização de novos compostos de origem natural, tanto pode ser para substituir os antimicrobianos convencionais como atuar sinergicamente com estes, sendo necessário uma menor concentração destes, acelerando o processo de eliminação dos microrganismos patogénicos.

Como projetos futuros, e no sentido de dar continuidade a esta investigação, sugere-se o estudo de terapias de combinação com os extratos de grainhas e engaço utilizados e o aperfeiçoamento dos métodos de extração, de forma a torná-los mais eficientes, tendo em consideração a atividade antimicrobiana e antioxidante existentes. É ainda necessária a avaliação da toxicidade destes subprodutos, e a análise de todas as atividades biológicas dos compostos bioativos existentes nos mesmos, tendo sempre também como objetivo o aumento da biodisponibilidade destes fitoquímicos.

IV. BIBLIOGRAFIA

- Aboody, M. S. A. e Mickymaray, S. (2020). Anti-Fungal Efficacy and Mechanisms of Flavonoids. *Antibiotics (Basel)*, 9(2), pp.
- Barreales, D. *et al.* (2018). *Effect of deficit irrigation in the cultivars Touriga Nacional and Touriga Franca (Vitis vinifera L.) in the Douro Demarcated Region (Portugal)*.
- 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. *Food Research International*, 65, pp. 375-384.
- Blackford, M. *et al.* (2021). A Review on Stems Composition and Their Impact on Wine Quality. *Molecules*, 26(5), pp. 1240.
- Boeira Cataneo, C. *et al.* (2008). Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. *Semina: Ciências Agrárias*, 29(1), pp. 93-101.
- Cerqueira, F. *et al.* (2021). Mechanism of Antifungal Activity by 5-Aminoimidazole-4-Carbohydrazonamide Derivatives against *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Antibiotics*, 10(2), pp. 183.
- Cheung, G. Y. C., Bae, J. S. e Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), pp. 547-569.
- Costa, A. S. G. *et al.* (2014a). Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. *Industrial Crops and Products*, 53, pp. 350-357.
- Costa, A. S. G. *et al.* (2018). Nutritional, chemical and antioxidant/pro-oxidant profiles of silverskin, a coffee roasting by-product. *Food Chemistry*, 267, pp. 28-35.

- Costa, E. *et al.* (2014b). Anthocyanin profile and antioxidant activity from 24 grape varieties cultivated in two Portuguese wine regions. *OENO One*, 48(1), pp. 51-62.
- Fernandes, L. *et al.* (2013). Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. *Food Research International*, 50(1), pp. 161-166.
- Gómez-Gaviria, M. e Mora-Montes, H. M. (2020). Current Aspects in the Biology, Pathogeny, and Treatment of *Candida krusei*, a Neglected Fungal Pathogen. *Infection and Drug Resistance*, 13, pp. 1673-1689.
- Hashemi Fesharaki, S. *et al.* (2018). Catheter-related candidemia and identification of causative *Candida* species in patients with cardiovascular disorder. *Curr Med Mycol*, 4(2), pp. 7-13.
- Jamiu, A. T. *et al.* (2021). Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. *Med Mycol*, 59(1), pp. 14-30.
- Joshi, D. e Adhikari, N. (2019). An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity. *Journal of Pharmaceutical Research International*, pp. 1-18.
- Krasteva, D. *et al.* (2023). Antimicrobial Potential, Antioxidant Activity, and Phenolic Content of Grape Seed Extracts from Four Grape Varieties. *Microorganisms*, 11(2), pp.
- Leal, C. *et al.* (2021). Assessing the Relationship Between the Phenolic Content and Elemental Composition of Grape (*Vitis vinifera* L.) Stems. *Waste and Biomass Valorization*, 12(3), pp. 1313-1325.
- Leal, C. *et al.* (2020a). Potential application of grape (*Vitis vinifera* L.) stem extracts in the cosmetic and pharmaceutical industries: Valorization of a by-product. *Industrial Crops and Products*, 154, pp. 112675.
- Leal, C. *et al.* (2020b). Recovery of bioactive compounds from white grape (*Vitis vinifera* L.) stems as potential antimicrobial agents for human health. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(4), pp. 1009-1015.

- Lee, A. S. *et al.* (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), pp. 18033.
- Lopes, J. P. e Lionakis, M. S. (2022). Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence*, 13(1), pp. 89-121.
- Lordêlo Cardoso Silva, M. *et al.* (2010). Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*, 31(3), pp. 669-681.
- Mattos, G. N. *et al.* (2017). Grape by-product extracts against microbial proliferation and lipid oxidation: a review. *J Sci Food Agric*, 97(4), pp. 1055-1064.
- Moreira, M. M. *et al.* (2018). Potential of Portuguese vine shoot wastes as natural resources of bioactive compounds. *Sci Total Environ*, 634, pp. 831-842.
- Nassiri-Asl, M. e Hosseinzadeh, H. (2016). Review of the Pharmacological Effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its Bioactive Constituents: An Update. *Phytother Res*, 30(9), pp. 1392-1403.
- Niculescu, V.-C. e Ionete, R.-E. (2023). An Overview on Management and Valorisation of Winery Wastes. *Applied Sciences*, 13(8), pp. 5063.
- Oliveira, D. A. *et al.* (2013). Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. *Journal of Biotechnology*, 164(3), pp. 423-432.
- Parlamento Europeu. [Em linha]. Disponível em <<https://www.europarl.europa.eu/news/pt/headlines/economy/20151201STO05603/economia-circular-definicao-importancia-e-beneficios>>. [Consultado em 28/08/2023].
- Poirel, L. *et al.* (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*, 6(4), pp.
- Prozil, S. O. *et al.* (2013). Chemical and structural characterization of grape stalks and evaluation of its potential as lignocellulosic raw materials. pp. 23-40.

- Riley, L. W. (2020). Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*, 8(4), pp.
- Rockenbach, I. I. *et al.* (2011). Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. *Food Research International*, 44(4), pp. 897-901.
- 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. *Molecules*, 25(16), pp. 3748.
- Soares, B., Pinto, T. e Pereira, L. (2020a). Touriga Franca. pp.
- Soares, B., Pinto, T. e Pereira, L. (2020b). Touriga Nacional pp.
- Sousa, C., Vinha, A. F. e Nunes, A. (2017). Desperdícios da vinicultura: potenciais aplicações e sustentabilidade pp. 1-65.
- Talapko, J. *et al.* (2021). *Candida albicans*—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *Journal of Fungi*, 7(2), pp. 79.
- Troilo, M. *et al.* (2021). Bioactive Compounds from Vine Shoots, Grape Stalks, and Wine Lees: Their Potential Use in Agro-Food Chains. *Foods*, 10(2), pp.
- Trošt, K. *et al.* (2016). Polyphenol, antioxidant and antimicrobial potential of six different white and red wine grape processing leftovers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(14), pp. 4809-4820.
- Ullah, A. *et al.* (2020). Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules*, 25(22), pp. 5243.
- Vázquez-Armenta, F. J. *et al.* (2017). Antibacterial and antioxidant properties of grape stem extract applied as disinfectant in fresh leafy vegetables. *Journal of Food Science and Technology*, 54(10), pp. 3192-3200.

Vinha, A. F. *et al.* (2022). Fitoquímicos do bagaço da uva: ingrediente funcional em produtos cárneos. *In: LHA, C. (ed.) Alimentação, Nutrição e Cultura 2*. Ponta Grossa, Brasil, Atena Editora, pp. 62-74.

Zambon, I. *et al.* (2018). Rethinking Sustainability within the Viticulture Realities Integrating Economy, Landscape and Energy. *Sustainability*, 10(2), pp. 320.