

***Vitis vinera* L. pomace: chemical and nutritional characterization**

Caracterização química e nutricional do bagaço de Vitis vinera L.

Marisa Nicolai^{1*}, Paula Pereira^{1,2*}, Patrícia Rijo^{1,3}, Olga Amaral⁴, Anabela Amaral⁴, Lídia Palma¹

¹ Center for Research in Biosciences & Health Technologies (CBIOS), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 1749-024 Lisboa, Portugal

² Center for Natural Resources and Environment (CERENA), Instituto Superior Técnico (IST), Universidade de Lisboa, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal

³ Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.U LISBOA), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, 1649-003 Lisboa, Portugal

⁴ Departamento de Tecnologias e Ciências Aplicadas, Instituto Politécnico de Beja, Campus do IPBeja, Apartado 6155, 7800-295 Beja, Portugal
Email:marisa.nicolai@ulusofona.pt

*Shared first authorship

Abstract

Grape pomace is a potential source of various chemical compounds that can be applied in pharmaceutical, cosmetic industries, and specially in food industries to improve nutritional characteristics. The aim of this study was the characterization of five grape pomace samples of two different Portuguese regions, Alentejo and Ribatejo. To this end, pH (3.77-4.52), ash content (3.69-7.93%), moisture content (5.23-15.10%), total phenolic content (0.16-1.93 mmol GA Eq./g extract), antioxidant activity inhibition (2.59-80.59%) and protein (trace) levels were determined. A high correlation between the antioxidant activity and phenolic content was found. Based on the results obtained, the inclusion of grape pomace in the industrial production of food can be a step towards the future of nutrition and human health given its high antioxidant content“ or „considering its high antioxidant content.

Keywords: *Vitis vinera*, grape pomace, antioxidants, phenolic content.

Resumo

O subproduto da vinificação é uma potencial fonte de diversos compostos químicos que podem ser aplicados nas indústrias farmacêutica e cosmética e especialmente na indústria alimentar no sentido de melhorar as características nutricionais. O objetivo deste estudo foi a caracterização de cinco subprodutos diferentes da vinificação de duas regiões portuguesas, o Alentejo e o Ribatejo. Neste sentido, determinou-se o pH (3,77-4,52), teor de cinzas (3,69-7,93 %), teor de humidade (5,23-15,10 %), teor de fenóis totais (0,16-1,93 mmol AG Eq /g de extrato), inibição atividade antioxidante (2,59-80,59 %) e proteína (vestigiais). Os resultados mostraram uma elevada correlação entre a atividade antioxidante e os teores de fenóis.

Com base nos resultados obtidos, a inclusão de bagaço de uva na produção industrial de alimentos pode constituir um importante contributo para o futuro da alimentação e nutrição humana considerando o seu elevado teor em antioxidantes.

Palavras-chave: *Vitis vinera*, subprodutos da vinificação, antioxidantes, conteúdos fenóis

Introduction

The wine industry in Portugal is one of the main economic resources of the country. In the last ten years there has been an annual average production in the order of 6 million hl [1]. This quantity of wine generates about 200 000 tons of grape pomace per year [2].

Grape pomace is the mass of solids (skins, stems and seeds) remaining after pressing, for whites, and after the wine has been drained from fermentation, for reds. Portuguese regulation (EC) 1493/1999 defines it as the pressing residue of fresh grapes, fermented or not.

Regarding to grape pomace, it is possible to distinguish two types, according on the technology of the wine production. On one hand, it can be designated as sweet or fresh grape pomace, which gives rise to white wines which do not ferment with the grape pomace and contain a low alcohol content and high sugar levels. On the other hand, the red or fermented grape pomace obtained from the fermentation of the solid waste in contact with the liquid part and then pressed has a higher alcohol content [2]. Consequently, the characteristics of the grape pomace will define the quality of the wine and the residues obtained after the pressing process [3].

Due to the lack of alternative uses with economic value, the waste obtained continues to be undervalued, being used in distilleries or discarded in landfills. In distilleries it continues to be traditionally used to produce spirits and liqueurs [4]. Other applications include use as fertilizer [5], however with limitations, due to the high content of phenols that are potentially toxic to the soil microbiota and due to the low content of some micronutrients such as phosphorus, potassium and magnesium, essentials to the soils [6]. Consequently, other alternatives have been more recently proposed for the revaluation of waste from winemaking. These by-products have been studied with the purpose of being used in human food, due to their high nutritional value [4], as well as other beneficial properties for human health [7-9].

The present study includes chemical and nutritional characterization of five grape pomace preparation samples since the composition of the grapes may depend on extrinsic agents, such as geo-climatic conditions and winemaking practices, as well as intrinsic factors such as variety, maturity and sanitary conditions. Likewise, the processing and winemaking conditions may influence the composition of the collected grape pomace.

The characterization of the residues includes a set of physical and chemical analyzes from collected samples after the vinification process in Portuguese wineries.

The analyses included the determination of moisture, ashes, pH, proteins, total phenolic content and antioxidant activity.

Introdução

A indústria vitivinícola em Portugal constitui um dos principais recursos económicos, que nos últimos 10 anos registou uma produção média anual na ordem dos 6 milhões de hectolitro [1]. Esta quantidade de vinho gera cerca de 200 000 toneladas/ano de resíduo da vinificação (bagaço da uva) [2].

O bagaço da uva, constituído por engaços, pedúnculos, películas e grainhas, resulta da prensagem das massas vínicas, constituídas pelas partes sólidas das uvas e pelo mosto ou pelo conjunto mosto/vinho que as embebe. O Regulamento (CE) 1493/1999 define-o como sendo o resíduo da prensagem das uvas frescas, fermentado ou não.

Relativamente ao bagaço, podemos distinguir dois tipos, consoante a tecnologia utilizada no fabrico do vinho, podendo ser bagaço doce ou fresco, que dá origem aos vinhos brancos que não fermentam com os mostos, contendo um baixo teor de álcool e um elevado teor de açúcar; e o bagaço tinto ou fermentado, que é obtido da fermentação dos resíduos sólidos em contacto com a parte líquida e posteriormente prensado, que apresenta um teor de álcool mais elevado [2]. Consequentemente, as características do bagaço vão definir a qualidade do vinho e dos resíduos obtidos após o processo de prensagem [3].

Devido à falta de alternativas de utilização, com benefícios económicos, os resíduos obtidos continuam a ser subvalorizados, sendo um dos destinos, o uso nas destilarias ou descarte em aterros. Nas destilarias continuam a ser utilizados tradicionalmente para produzir aguardentes e licores [4]. Outras aplicações incluem o seu uso como fertilizante [5], contudo limitado, devido ao elevado conteúdo de fenóis que são potencialmente tóxicos para a microbiota do solo, para além do escasso teor de alguns micronutrientes como fósforo, potássio e magnésio [6]. Face a esta realidade, mais recentemente, têm sido propostas outras alternativas no sentido da revalorização dos resíduos da vinificação. Estes subprodutos têm vindo a ser estudados com vista à sua utilização na alimentação humana devido ao facto de apresentarem elevado valor nutritivo [4], para além de outras propriedades benéficas para a saúde [7-9].

O presente estudo inclui a caracterização química e nutricional preliminar destes subprodutos uma vez que a composição das uvas pode variar dependendo de alguns agentes extrínsecos, tais como condições geoclimáticas e práticas vitícolas, bem como de fatores intrínsecos, como variedade, maturidade e condições sanitárias. Da mesma forma, o tipo de processo e as condições sobre as quais a vinificação é realizada influenciam a composição dos subprodutos recolhidos.

Material and methods

Biological samples

The samples are grape pomace of the species *Vitis vinifera* L., from the vinification, collected in 2017, under non-specific conditions. Samples A and B, both from of the variety *arinto*, were collected in Herdade da Malhadinha Nova, Alentejo. Sample C, variety *aragonesa*, was collected in Herdade da Bombeira, Alentejo. Samples D and E, variety *talia*, were collected in Herdade de Vila Chã, Ribatejo.

Reagents

Folin-Ciocalteu reagent, gallic acid, sodium carbonate, ascorbic acid, hydrochloric acid 37 % (v/v) and dibasic sodium phosphate were purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany) and ethanol 96 % (v/v), boric acid, sodium hydroxide from VWR (Leuven, Belgium). Potassium phosphate monobasic, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, sodium carbonate, were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and potassium sulphate pentahydrate, sulfuric acid 98 % (v/v) from Panreac (Barcelona, Spain).

Methodology

Drying method

Samples A, C, D and E were dried in an oven with air circulation mechanism (J.P. Selecta, Barcelona, Spain) for 24 hours at 60 °C. Sample B was air dried until the characteristics matched of the samples obtained in the previously mentioned process. The samples were then milled in a domestic blade grinder (Moulinex, Alencon, France) and stored at room temperature, away from the light, in properly sealed propylene bags, until analysis.

Ultrasonic extraction

For extraction, 10 g of each sample and 100 mL of ethanol 96 % (v/v) were combined in a 250 mL Erlenmeyer flask and held in ultrasonic bath for 30 minutes at room temperature (VWR Cleaner USC-TH). The extract was gravimetrically filtered, aliquoted and stored at -20 °C until to analysis.

A caracterização dos resíduos contempla um conjunto de análises físico-químicas das amostras recolhidas, após vinificação, em diferentes adegas portuguesas. Estas análises incluem a determinação de humidade, cinzas, pH, proteínas, teor de fenóis totais e respetiva atividade antioxidante.

Material e Métodos

Amostras biológicas

As amostras são subprodutos provenientes da vinificação da espécie *Vitis vinifera* L., de 2017. As amostras A e B, ambas da casta arinto, foram recolhidas na Herdade da Malhadinha Nova, Alentejo. A amostra C, casta aragonesa, foi recolhida na Herdade da Bombeira, Alentejo. As amostras D e E, casta tália, foram recolhidas na Herdade de Vila Chã, Ribatejo.

Reagentes

Reagente Folin–Ciocalteu, ácido gálico, carbonato de sódio, ácido ascórbico, ácido clorídrico 37 % (v/v), fosfato de sódio dibásico foram adquiridos na SigmaAldrich (Steinheim,Germany) e o etanol 96 % (v/v), ácido bórico, hidróxido de sódio na VWR (Leuven, Belgium). Fosfato de potássio monobásico, 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, carbonato de sódio, foram adquiridos na Merck (Darmstadt,Germany) e sulfato de potássio pentahidratado, ácido sulfúrico 98 % (v/v) na Panreac (Barcelona, Spain)

Metodologia

Método de secagem

As amostras A, C, D e E foram secas na estufa (J.P. Selecta, Barcelona, Espanha), durante 24 horas a 60 °C. A amostra B foi seca ao ar até adquirir as características das amostras obtidas no processo anteriormente mencionado. Seguidamente foram moídas num triturador de lâminas doméstico (Moulinex, Alencon, França) e armazenadas em sacos de propileno devidamente selados, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, até análise.

Extração por ultrassons

No método de extração, pesou-se 10 g de cada amostra e adicionou-se 100 mL de etanol a 96 % (v/v) num Erlenmeyer de 250 mL, e durante 30 minutos, à temperatura ambiente, manteve-se num banho de ultrassons (VWR Cleaner USC-TH). O extrato foi posteriormente

pH measurement

To each 10 g of sample, previously pulverized, 100 mL of distilled water was added. The suspension was shaken and then the pH values were measured using a potentiometer (Hanna Instruments pH 211 Microprocessor, Padova, Italy). All assays were performed in triplicate.

Moisture content

To determine the amount of water contained in each of the samples under study, 5 g of sample was weighed and then placed in the oven (J.P. Selecta, Barcelona, Spain) with forced air circulation at 105°C for 4 hours. After this time, the samples were cooled to room temperature in a desiccator. The heating/cooling process was repeated until the weight was stabilized. The moisture was then calculated by the difference in mass of the sample before and after drying and the result was expressed as a percentage (Equation 1). All assays were performed in triplicate.

$$\text{Moisture content (\%)} = \frac{(m_{\text{initial sample}} - m_{\text{dry sample}})}{m_{\text{initial sample}}} \times 100 \quad \text{Equation 1}$$

Ash content

Determination of the ash required weighing 2 g of the sample, drying in the oven (J.P. Selecta, Barcelona, Spain) with forced air circulation at 105 °C for 2 hours, and subsequent placement in the muffle furnace (J.P. Selecta-Horn, Barcelona, Spain) for 4 hours at 550 °C. After this period the samples were cooled to room temperature in a desiccator to gravimetrically determine the ash content, using Equation 2. All assays were performed in triplicate.

$$\text{Ash content (\%)} = \frac{m_{\text{ash}}}{m_{\text{initial ash}}} \times 100 \quad \text{Equation 2}$$

filtrado por gravimetria, separado em alíquotas e armazenado a -20 °C até análise.

Determinação de pH

A cada 10 g de amostra, previamente pulverizada, adicionou-se 100 mL de água destilada. Agitou-se a suspensão e em seguida procedeu-se à medição dos valores de pH, usando um potenciômetro (Hanna Instruments pH 211 Microprocessor, Padova, Itália). Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

Teor de humidade

Para a determinação da quantidade de água contida em cada uma das amostras em estudo, procedeu-se à pesagem de 5 g de amostra e posterior colocação na estufa (J.P. Selecta, Barcelona, Espanha) com circulação de ar forçada, a 105 °C, durante 4 horas. Após este período, as amostras foram arrefecidas à temperatura ambiente num exsicador. O processo de aquecimento/arrefecimento repete-se até estabilização do peso. A humidade foi então calculada pela diferença de massa da amostra antes e após secagem e o resultado foi expresso em percentagem (Equação 1). Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

$$\text{Teor de humidade (\%)} = \frac{(m_{\text{amostra inicial}} - m_{\text{amostra seca}})}{m_{\text{amostra inicial}}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Teor de cinzas

A obtenção das cinzas, pressupõe pesagem de 2 g de amostra, secagem na estufa (J.P. Selecta, Barcelona, Espanha) com circulação de ar forçada, a 105 °C, durante 2 h e posterior colocação na mufla (J.P. Selecta-Horn, Barcelona, Espanha) durante 4 h, a 550 °C. Após este período, as amostras foram arrefecidas à temperatura ambiente num exsicador para serem seguidamente determinados, gravimetricamente, os teores de cinzas, através da Equação 2. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

$$\text{Teor de cinza (\%)} = \frac{m_{\text{cinza}}}{m_{\text{amostra inicial}}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Total phenolic content

The total phenolic content was determined according to the colorimetric method adapted from Folin Ciocalteu described by Singleton and Rossi [10]. 200 µL of the diluted Folin-Ciocalteu reagent solution in water (1:10) was added to each 100 µL sample or standard. The mixture was allowed to stand for 5 minutes, followed by the addition of 1000 µL of 15 % (w/v) sodium carbonate and 2000 µL of distilled water and allowed to stand for 60 minutes, in the dark. Absorbance of the standards and samples were measured in the spectrophotometer (Hitachi U-2010, Tokyo, Japan) at 765 nm. All samples were pre-diluted (1:200) in 96 % (v/v) ethanol and the analyzes were performed in triplicate. Quantification of the samples was performed using a calibration curve ($y=0.0022x+0.0013$, $R^2=0.999$) with gallic acid as standard, with concentrations ranging from 2.5 µg/mL to 100 µg/mL. The results are expressed as gallic acid equivalent (Eq. GA) per gram of extract [11].

DPPH assay

The antioxidant activity was determined by the DPPH method [11]. Each 10 µL of standard or sample was added 990 µL of the DPPH solution at 100 µM. Subsequently, absorbance measurements were performed at 515 nm after 60 minutes incubation at room temperature in the absence of light using distilled water as blank. The results of the antioxidant activity were expressed as percent inhibition (I %), using the following expression (Equation 3).

$$I (\%) = \frac{Abs_{Blank} - Abs_{sample}}{Abs_{Blank}} \times 100 \quad \text{Equation 3}$$

Protein content

Protein content determination was performed based on the Kjeldhal methodology [12]. For this analysis, 2 g of each sample were weighed and placed in Kjeldhal tubes, followed by the addition of the catalyst (1.5 g of potassium sulphate and 0.5 g of copper sulphate) and 25 mL of sulfuric acid. The digestion of the mixture was carried out in three different cycles of temperature/time (150°C, 30 minutes, 270°C for, 30 minutes and 400°C, for 90 minutes). After digestion and cooling, distilled water was added to a final volume of 80 mL and the so-

Teor de fenóis totais

De acordo com o método colorimétrico adaptado de Folin Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi [10], determinou-se o teor de compostos fenólicos totais. A cada 100 µL de amostra/padrão foram adicionados 200 µL da solução de reagente Folin-Ciocalteu diluída em água (1:10). A mistura permaneceu em repouso durante 5 minutos, seguindo-se a adição de 1000 µL de carbonato de sódio a 15 % (m/v) e 2000 µL de água destilada e deixou-se em repouso durante 60 minutos ao abrigo da luz. As absorvâncias dos padrões e amostras foram medidas no espectrofotômetro (Hitachi U-2010, Tóquio, Japão), a 765 nm. Todas as amostras foram previamente diluídas (1:200) em etanol 96 % (v/v) e as análises foram realizadas em triplicado. A quantificação das amostras foi realizada recorrendo a uma curva de calibração ($y=0,0022x+0,0013$, $R^2=0,999$) com ácido gálico como padrão, tendo as concentrações variado entre 2,5 µg/mL e 100 µg/mL. Os resultados são expressos em equivalente de ácido gálico (AG Eq) por grama de extrato [11].

Método de DPPH

A atividade antioxidante foi determinada pelo método de DPPH [11]. A cada 10 µL de padrão/amostra foram adicionados 990 µL da solução de DPPH a 100 µM. Posteriormente, foram realizadas medições de absorvância, a 515 nm, após 60 minutos de incubação à temperatura ambiente, na ausência de luz, utilizando-se como branco a água destilada. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em percentagem de inibição (I %), utilizando a seguinte expressão (Equação 3).

$$I (\%) = \frac{Abs_{Branco} - Abs_{amostra}}{Abs_{Branco}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Teor de proteínas

A determinação do teor proteico foi realizado com base na metodologia de Kjeldhal [12]. Para esta análise, foram pesados 2 g de cada amostra, que foram colocados em tubos de Kjeldhal, seguindo-se a adição do catalisador (1,5 g de sulfato de potássio e 0,5 g de sulfato de cobre) e 25 mL de ácido sulfúrico. A digestão da mistura foi realizada em três ciclos diferentes de temperatura / tempo (150 °C, durante 30 minutos; 270 °C durante, 30 minutos e 400 °C, durante 90 minutos). Após a digestão e arrefecimento, adicionou-se água destilada até

lution obtained was distilled. After this step, the distillate was collected in an Erlenmeyer flask, to which was added 10 mL boric acid and Tashiro indicator.

Then, the distillate was titrated with a standard solution of 0.1 M hydrochloric acid. From the volume of hydrochloric acid consumed, the nitrogen content (Equation 4) and consequently the protein content was determined.

$$\text{Protein content (\%)} = (V/m) \times 0,875 \quad \text{Equation 4}$$

Results and Discussion

The main finality of this study was to determine the chemical and nutritional characterization of the studied grape pomace in order to use this by-product in the human diet. Preliminary results include yield extraction, pH measurement, moisture and ash content. These results were generated from five samples corresponding to three distinct varieties collected in Portugal. Samples A and B only differ in the drying process applied after collection.

Ultrasonic extraction

Ultrasound extraction is a quick and easy method to perform. The yields obtained for the collected samples, where ethanol was used as solvent, were between 14.90 and 25.34% (w/w). Samples A (14.91%) and B (14.90%) showed similar yields. Samples D (23.23%) and E (25.34%) presented the highest values, while sample C (9.26%) had the lowest value (Table 1).

pH measurement

The pH values of the samples varied between 3.77 and 4.52, showing an acidic character. The determined values did not show significant variations between the five studied samples, and these values of pH are similar to those found by other authors (3.6-4.0) in studies of winemaking residues [13-14]. According to Sousa [15] values between 4.0 and 4.5 are more favorable for fungal growth, whereas samples with pH closer to neutral, between 6.5 and 7.0, offer better bacterial growth con-

per fazer os 80 mL e procedeu-se à destilação da mistura obtida no destilador. A recolha do destilado foi realizada num balão Erlenmeyer, ao qual se adicionou 10 mL ácido bórico e indicador Tashiro.

Em seguida, procedeu-se à titulação do destilado com uma solução padronizada de ácido clorídrico 0,1 M. A partir do volume de ácido clorídrico consumido foi determinado o teor de azoto (Equação 4) e consequentemente o teor proteico.

$$\text{Proteína bruta (\%)} = (V/m) \times 0,875 \quad \text{Equação 4}$$

Sendo V o volume (em mL) de ácido clorídrico 0,1 M gasto na titulação e m a massa inicial (em g) da amostra.

Resultados e Discussão

Sendo a principal finalidade deste estudo a caracterização química e nutricional dos resíduos da vinificação para a aplicação deste subproduto na alimentação humana, os resultados preliminares contemplam a determinação do rendimento de extração, pH, teores de humidade, cinzas, fenóis totais e atividade antioxidante. Estas determinações são relativas a cinco amostras, que correspondem a três castas distintas, recolhidas em Portugal, sendo que duas destas amostras (A e B) apenas diferem no processo de secagem aplicados após a recolha.

Extração por ultrassons

A extração por ultrassons é um método rápido e de fácil execução. Os rendimentos obtidos para as amostras em análise, utilizando o etanol como solvente, situam-se entre 14,90 e 25,34 % (m/m). As amostras A (14,91 %) e B (14,90 %) apresentam rendimentos semelhantes. As amostra D (23,23 %) e E (25,34 %) apresentaram os valores de rendimento mais elevados, enquanto que a amostra C (9,26 %) apresentou o menor valor (Tabela 1).

Determinação de pH

Os valores de pH das amostras variaram entre 3,77 e 4,52, mostrando um caráter ácido de todas as amostras etanólicas, não se evidenciando variações significativas nos valores de pH das diferentes amostras. Os valores de pH obtidos são semelhantes aos encontrados por outros autores, em estudos com resíduos de vinificação, que variaram entre 3,6 a 4,0 [13-14]. Segundo Sousa [15], as amostras com pH entre 4,0 e 4,5 são mais propícias para o crescimento de fungos, ao passo que

Table 1/ Tabela 1 - Yield, pH, moisture content, ash content (cv = covariance) results/
Resultados rendimento, pH, teor de humidade, teor de cinzas (cv = covariância)

Sample/ Amostra	A	B	C	D	E
Yield (% w/w)/ Rendimento (% m/m)	14.91	14.90	9.26	23.23	25.34
pH	4.52±0.01	4.47±0.01	3.77±0.01	3.86±0.01	4.28±0.01
Moisture content ± cv (%)/ Teor humidade ± cv (%)	14.64±1,80	15.10±1.99	7.92±4.42	8.02±5.42	5.23±1.20
Ashes content± cv (%)/ Teor cinzas ± cv (%)	5.56±0.01	5.55±0.03	7.93±0.80	4.00±0.08	3.69±0.06

ditions. Thus, the samples storage conditions need to be monitored to specifically control fungal growth.

Moisture content

The values obtained in the determination of the moisture content vary from 5.23% to 15.10% possibly due to the different types of grape varieties and pressing processes used to obtain the samples during vinification. Samples A and B have a similar moisture content, about 15%, while samples C, D and E have a much lower moisture content, in the range of 5% to 8%.

The critical moisture level to prevent growth of microorganisms, including pathogens, is related to the characteristics of the products. According to Strapasson [13], the critical range of moisture content in dehydrated fruits is between 18-25%. In the case of winemaking by-products, the presence of a high moisture content may, as in other dry food products, promote the degradation of residues by microbial and/or enzymatic action, which may compromise the use of these samples [4].

Ash content

The ash content reveals the total mineral content in food. Determining the ash content may be important for several reasons, as it may be part of the immediate analysis for nutritional assessment. Thus, this amount may vary depending on soil and climatic conditions, viticulture practices and vinification process. The type

amostras com pH mais próximos do neutro, entre 6,5 e 7,0, são as que apresentam as melhores condições de crescimento bacteriano. Deste modo, as condições de armazenamento das amostras necessitam de ser monitorizadas para controlar especificamente o crescimento fúngico.

Teor de humidade

Os valores obtidos na determinação do teor de humidade, variam entre 5,23 % a 15,10 % possivelmente devido aos tipos de castas e processos de prensagem utilizados na obtenção das amostras durante a vinificação. As amostras A e B têm um teor de humidade semelhante, cerca de 15 %, enquanto as amostras C, D e E apresentam um teor de humidade bastante inferior, numa gama entre 5 % e 8 %.

O teor crítico de humidade para evitar crescimento de microrganismos, incluindo os patogénicos, está relacionado com as características dos produtos. Segundo Strapasson [13], o intervalo crítico do teor de humidade em frutas desidratadas encontra-se entre 18-25%. No caso dos subprodutos da vinificação a presença de um teor elevado de humidade pode, como noutros produtos alimentares vegetais secos, promover a degradação dos resíduos por ação microbiana e/ou enzimática o qual pode comprometer a utilização destes materiais [4].

Teor de cinzas

O teor de cinzas revela o conteúdo mineral total nos alimentos. Determinar o teor de cinzas pode ser importante por várias razões, pois pode fazer parte da análise imediata para avaliação nutricional. Assim, esta quantidade pode variar consoante condições edafoclimáticas,

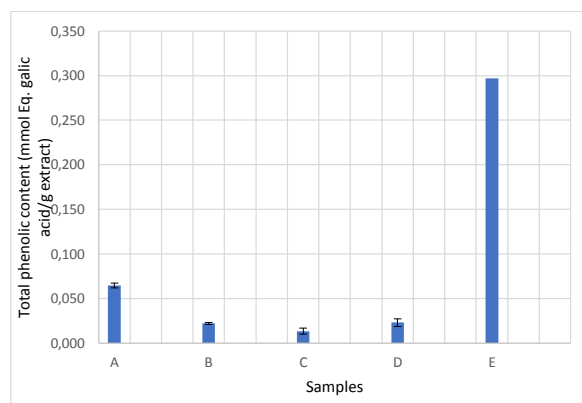
and time scale of the maceration used during the wine-making process may influence the extraction and reabsorption of minerals, which may affect the mineral content of the by-products obtained [4].

The ash content, determined by mineralization of the samples at 550°C, ranged from 3.69% to 7.93%. The results of the preliminary nutritional assessment of the five samples are summarized in Table 1. The values obtained in this study were lower than those obtained by Strapasson [13], which obtained values close to 7% for Syrah and Bordeaux grape varieties and 8% for the Tannat grape variety. This disparity of values could be due to the different edaphoclimatic conditions.

Total phenolic content

The content in phenolic compounds depends on the type of grapes cultivated, the geographical location of the vines, the type of climate, the soil conditions, the extraction method and the solvent [16].

The total phenolic content for the five samples obtained from the Folin-Ciocalteu method ranges from 0.16 to 1.93 mmol GA Eq/g of extract, where the minimum value was obtained by sample D and the maximum by the sample E. The results obtained are represented in Figure 1.



práticas de viticultura e processo de vinificação. O tipo e duração da maceração utilizado durante o processo de vinificação pode influenciar a extração e reabsorção dos minerais, o que pode afetar o teor de minerais nos subprodutos obtidos [4].

O teor de cinzas foi determinado por mineralização das amostras a 550 °C, tendo variado entre os 3,69% e 7,93%. Seguidamente, na Tabela 1 encontram-se resumos os resultados da avaliação nutricional preliminar das cinco amostras. Os valores obtidos neste estudo são inferiores aos indicados por Strapasson [13], onde obteve valores próximos de 7% para as castas Syrah e Bordeaux e 8% para a casta Tannat. Estas diferenças de valores também podem estar relacionadas com as diferentes condições edafoclimáticas.

Teor de fenóis totais

O teor de compostos fenólicos depende do tipo de cultura das uvas, da localização geográfica das vinhas, do tipo de clima, das condições do solo, do método de extração e do solvente utilizados [16].

Os valores obtidos, a partir de método de Folin-Ciocalteu, para as cinco amostras, variaram entre 0,16 e 1,93 mmol AG/Eq.g de extrato, sendo o valor mínimo o obtido pela amostra D e o máximo pela amostra E. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 1.

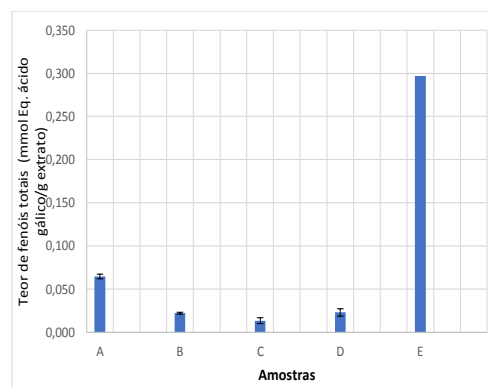


Figure 1/ Figura 1 – Total phenolic content of grape pomace extracts/
Teor de fenóis totais de extratos dos subprodutos da vinificação

DPPH assay

The radical scavenging activity was determined by the DPPH method, from which it was determined the percentages of inhibition (I %). The values obtained are shown in Figure 2, where the sample D stands out with an inhibition of 80.6 ± 3.8 %.

Phenolic compounds are the secondary metabolites

Método de DPPH

A atividade de captura do radical livre foi determinada pelo método de DPPH, a partir do qual foram determinadas as percentagens de inibição (I %). Os valores obtidos apresentam-se na figura que se segue (Figura 2), onde se destaca a amostra D com o percentagem de inibição de $80,6 \pm 3,8$ %.

from the winemaking by-products with the most important antioxidant properties [9,16].

Figure 3 shows the correlation between the results obtained from DPPH and Folin-Ciocalteu method. A high and significant correlation was obtained with a $R^2 = 0.933$, which indicate that the total of phenolic content obtained per gram of extract was directly proportional to the percentage of inhibition of the antioxidant activity, which reflects the need for future studies with qualitative and quantitative identification of individual compounds within the samples .

Os compostos fenólicos são os metabolitos secundários com propriedades antioxidantes mais importantes dos subprodutos da vinificação [9,16].

Na figura 3 encontra-se representada a correlação entre os resultados obtidos utilizando o DPPH e os resultados de compostos fenólicos totais, obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu. Uma elevada e significativa correlação foi obtida, com $R^2 = 0,933$, mostrando que, neste caso, a quantidade de fenóis totais obtidos por cada grama de extrato é diretamente proporcional à percentagem de inibição da atividade antioxidante o que indica a necessidade de estudos futuros com vista à identificação qualitativa e quantitativa dos constituintes das amostras.

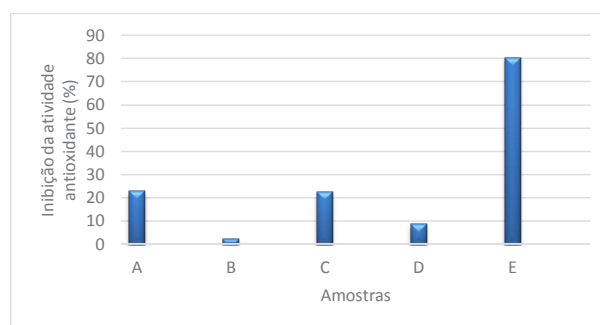
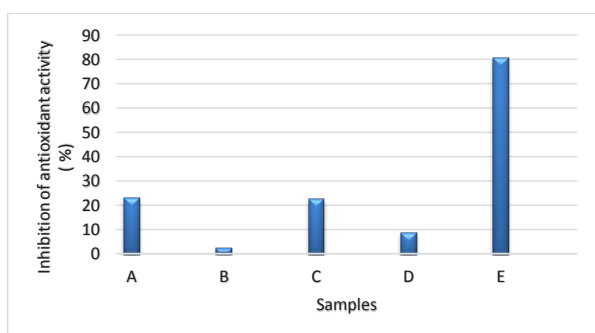


Figure 2/ Figura 2 – Percentage inhibition of antioxidant activity of grape pomace extracts/ Percentagem de inibição da atividade antioxidante de extratos dos subprodutos da vinificação

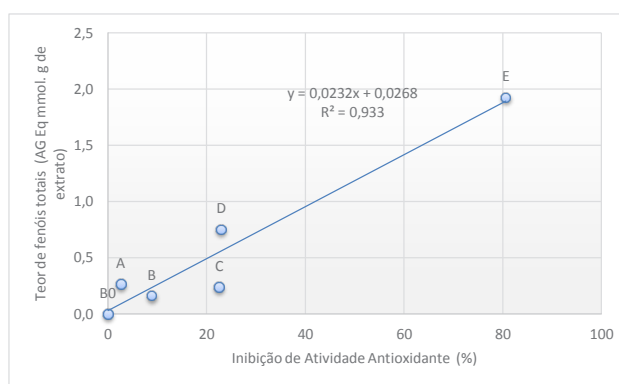
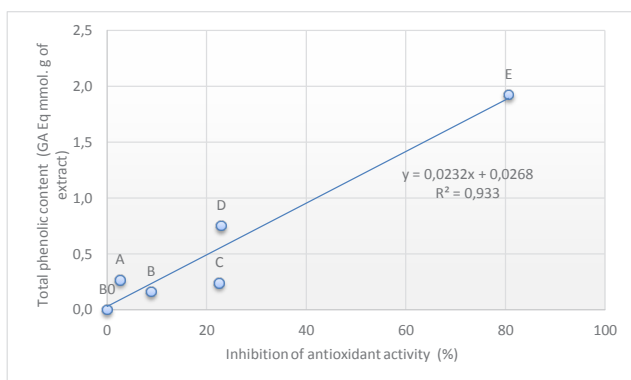


Figure 3/ Figura 3 – Correlation between the total phenolic content and the inhibition of antioxidant activity/ Correlação entre o teor de fenóis totais e a inibição de atividade antioxidante

Proteins content

The Kjeldahl method allows the determination of nitrogen and the calculation of protein content in a wide variety of materials such as food, fertilizer, water waste, among others. However, in this study, the levels of protein present in the samples were vestigial, therefore we could not analytically quantify them, contrary to what was expected [15].

Conclusion

This study, which includes the determination of the chemical and nutritional properties of five samples of *Vitis vinera* L. pomace, collected in Portugal during 2017, showed that grape pomace presents a high potential for its reevaluation and use in human diet. These five samples presented acidic pH and low moisture content which prevent the growth of microorganisms.

Ashes represent the amount of minerals present in a sample, minerals required by living organisms to perform various metabolic processes. The minerals of the human diet come essentially from plants and water. The average ash content value of the five samples was 5.35%, which is above the maximum value reached by fresh foods [17]. Consequently, these samples can be considered as a good source of minerals. However, it is necessary to complement with future studies of identification and quantification of the minerals present.

Regarding the content of antioxidant properties, the grape pomace samples studied showed radical scavenging activity and different outcomes for the total phenolic content, and it was possible to correlate these two variables and verify their linear dependence. Taking into account that samples A and B only differed in drying method, it is possible to verify that sample B has lower values than A, and this reduction may be due to the fact that sample B has not been dried under light and temperature control. In this way, the drying process of sample B may have contributed to the oxidation of some of the compounds.

In summary, in addition to the results obtained herein, some authors have also demonstrated that grape pomace contains important components for the human diet because of its tested effects on hypertension and anti-inflammatory processes [8].

Consequently, these residues have the potential to be considered a food ingredient in the human diet or as a nutritional supplement. This alternative may also contribute to winemaking waste reduction, to improve environmental aspects, and reduce production costs.

Proteínas

O método Kjeldahl permite a determinação do teor de azoto e consequente cálculo do conteúdo proteico numa grande variedade de materiais, desde alimentos, fertilizantes, águas residuais, entre outros. Contudo, as amostras apresentaram teores proteicos vestigiais, que não foram passíveis de quantificação analítica, contrariamente ao expectável [15].

Conclusão

Este estudo que inclui a determinação de propriedades químicas e nutricionais de cinco amostras da espécie *Vitis vinera* L., recolhidas em Portugal, em 2017, permitiu mostrar que os subprodutos da vinificação apresentam um elevado potencial para a sua revalorização e respetiva utilização na alimentação humana. Estes cinco exemplares apresentaram pH ácidos e baixo teor de humidade os quais podem prevenir crescimento de microorganismos.

As cinzas representam a quantidade de minerais presentes numa amostra, sendo requeridos pelo organismo vivos para a execução de diversos processos metabólicos. Os minerais da dieta humana provêm essencialmente de plantas e da água. Desta forma, tendo em conta que o valor médio do teor de cinza das cinco amostras foi 5,35 %, é possível constatar que este se encontra acima do valor máximo determinados em alimentos frescos [17]. Consequentemente, estas amostras podem ser consideradas como sendo uma boa fonte de minerais. Contudo, é necessário complementar, futuramente, com estudos de identificação e quantificação dos minerais presentes. No que concerne ao conteúdo de compostos com propriedades antioxidantes, os resíduos estudados exibiram atividades antioxidante e diferentes teores de fenóis totais, tendo sido possível correlacionar estas duas variáveis e verificar a sua dependência linear. Tendo em conta que as amostras A e B apenas diferiram no modo de secagem, é possível verificar que a amostra B apresenta valores mais baixos do que a amostra A, esta redução pode dever-se ao facto da amostra B não ter sido seca ao abrigo da luz, nem ter havido controlo de temperatura. Deste modo, o processo de secagem da amostra B poderá ter contribuído para a oxidação de alguns dos compostos.

Em suma, alguns autores têm demonstrado que os subprodutos da vinificação contêm componentes importantes para a dieta humana devido aos seus comprovados efeitos sobre a hipertensão e processos anti-inflamatório [8].

Face ao exposto, pode considerar-se que estes resíduos

Conflict of interests

The authors declare that there is no financial or personal relationship that can be understood as representing any potential conflict of interest.

são um potencial ingrediente alimentar para aplicação na dieta humana ou como um suplemento nutricional. Esta alternativa pode também vir a contribuir para a redução dos desperdícios da vinificação, melhorando os aspetos ambientais e reduzindo os custos de produção.

Conflito de Interesses

Os autores declaram que não existe uma relação financeira ou pessoal que possa ser entendida como representando um potencial conflito de interesses.

References / Referências

- [1] IVV-Instituto do Vinho e da Vinha. <http://www.ivv.gov.pt/np4/36/> (acesse in october 31, 2018).
- [2] Silva, L.M.L.R. (2003). Caracterização dos subprodutos da vinificação. *Spectrum*, 28, 123–33.
- [3] Makris, D.P., Dimitris p., Boskou, G., & Andrikopoulos. N.K. (2007). Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of food composition and analysis*, 20(2), 125–32.
- [4] Garcia-Lomillo, J., & González-Sanjosé, M.L. (2017). Applications of wine pomace in the food industry: approaches and functions. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 16(1), 3–22.
- [5] Arvanitoyannis, I.S., Ladas, D., & Mavromatis A. (2006). Potential uses and applications of treated wine waste: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 475–87.
- [6] Dwyer, K., Hosseinian, F., & Rod, M. (2014). The market potential of grape waste alternatives. *Journal of food research archives*, 3(2), 91-106.
- [7] Saura-Calixto F. (2012). Concept and health-related properties of nonextractable polyphenols: the missing dietary polyphenols. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 11195-2000.
- [8] Rasines-Perea, Z., Ky, I., Cros, G., Crozier, A., Teissedre, P.L. (2018). Grape pomace: antioxidant activity, potential effect against hypertension and metabolites characterization after intake. *Diseases*, 6(3), 60.
- [9] Castello, F., Costabile, G., Bresciani, L., Tassotti, M., Naviglio, D., Luongo, D., Ciciola, P., Vitale, M., Vetrani, C., Galaverna, G., Brighenti, F., Giacco, R., del Rio, D., & Mena, P. (2018). Bioavailability and pharmacokinetic profile of grape pomace phenolic compounds in humans. *Archives of biochemistry and biophysics*, 646, 1–9.
- [10] Singleton, V.L., & Rossi, J.A.Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.*, 16, 144-58.
- [11] Pereira, P., Cebola, M.J., Oliveira, C., & Bernardo-Gil, M.G. (2016). Supercritical fluid extraction vs conventional extraction of myrtle leaves and berries: Comparison of antioxidant activity and identification of bioactive compounds. *The journal of supercritical fluids*, 113, 1–9.
- [12] Official Methods of Analysis (2000). AOAC International, Gaithersburg, MD, Method 990.03.
- [13] Strapasson, G.C. (2016). Caracterização e utilização do resíduo de produção e vinho no desenvolvimento de alimentos com propriedade funcional (Tese de doutoramento). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
- [14] Manfroi, L., Miele, A., Rizzon, L.A., & Barradas, C.I.N. (2006). Composição química do mosto da uva ‘Cabernet Franc’ conduzida no sistema lira aberta. *Ciência e tecnologia alimentar*, 26(2), 290-6.
- [15] Sousa, E.C, Uchôa-Thomaz, A.M.A., Carioca, J.O.B., Morais, S. M., Lima, A., Martins, C.G., Alexandrino, C.D., Ferreira, P.A.T., Rodrigues, A.L.M., Rodrigues, S.P., Silva, J.N., Rodrigues, L.L. (2014). Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (*vitis vinifera* L.), benitaka variety, grown in the semiarid region of northeast brazil. *Food science and technology (Campinas)*, 34(1), 135–42.
- [16] Beres, C., Costa, G.N.S., Cabezudo I., Silva, J.N.K., Teles, A.S.C., Cruz, A.P.G., Mellinger, S.C., Tonon, R.V., Cabral, L.M.C., Freitas, S.P. (2017). Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: a review. *Waste management*, 68, 581–94.
- [17] Nielsen, S.S. (2010). *Food analysis*. West Lafayette: Springer.