

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM E
MICROENCAPSULAÇÃO POR *SPRAY DRYING* DE COMPOSTOS
FENÓLICOS DO BAGAÇO DE UVA

Karen Elbert Leal Mazza

Rio de Janeiro
2017



EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM E
MICROENCAPSULAÇÃO POR *SPRAY DRYING* DE COMPOSTOS
FENÓLICOS DO BAGAÇO DE UVA

Karen Elbert Leal Mazza

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (Alimentos).

Orientadora: Dr^a. Renata Valeriano Tonon
Co-orientadora: Dr^a. Renata Galhardo Borguini
Co-orientador: Dr. Alexandre Guedes Torres

Rio de Janeiro
Agosto/2017

Karen Elbert Leal Mazza

EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM E MICROENCAPSULAÇÃO POR
SPRAY DRYING DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO BAGAÇO DE UVA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

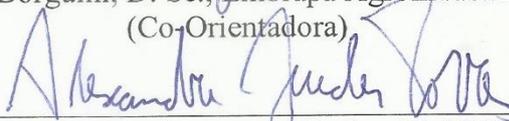
Aprovada em 30 de agosto de 2017.



Renata Valeriano Tonon, D. Sc., IQ-UFRJ/ Embrapa Agroindústria de Alimentos
(Orientadora)



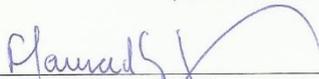
Renata Galhardo Borguini, D. Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos
(Co-Orientadora)



Alexandre Guedes Torres, D. Sc., IQ-UFRJ
(Co-Orientador)



Carlos Adam Conte Junior, D. Sc., IQ-UFRJ/ UFF
(Membro Titular)



Flavia dos Santos Gomes, D. Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos
(Membro Titular)

M477 Mazza, Karen Elbert Leal.

Extração assistida por ultrassom e microencapsulação por spray drying de compostos fenólicos do bagaço de uva / Karen Elbert Leal Mazza. -- Rio de Janeiro, 2017.
118 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos, 2017.

Orientador: Renata Valeriano Tonon.
Coorientador: Renata Galhardo Borguini.
Coorientador: Alexandre Guedes Torres.

1. Compostos fenólicos. 2. Bagaço de uva. 3. Ultrassom. 4. Spray drying. 5. Antocianinas. I. Tonon, Renata Valeriano. (Orient.). II. Borguini, Renata Galhardo. (Coorient.). III. Torres, Alexandre Guedes. (Coorient.). IV. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos. V. Título.

CDD: 664

*Dedico este trabalho à minha família,
por todo apoio e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por olhar sempre por mim, me fornecer a oportunidade de tantas experiências, e de grandes amizades;

À toda minha família, de forma inigualável meus pais, Paulo e Valeria, pois me apoiaram em todos os momentos e ao meu irmão, Kaio;

Ao meu namorado, Felipe, pela compreensão e por me estimular a perseverar sempre;

À minha orientadora, Renata Tonon, por toda paciência e auxílio e à co-orientadora Renata Borguini, por estar sempre disposta a ajudar;

Ao professor D. Sc. Ronoel Godoy, aos analistas Manuela Santiago e Sidney Pacheco e à técnica Luzimar Nascimento por terem me proporcionado a oportunidade de aprender as técnicas analíticas da área de Alimentos, me apoiando, incentivando e dividindo experiências profissionais;

Aos “Embrapianos”, estagiários e alunos do CLAE, Vítor de Carvalho, Elaine, Camila, Amanda, Diego, Yasmim, Raquel, Gleisa, Tássia, Caroline e Nathália, pois com eles as análises foram mais divertidas;

Aos técnicos das Plantas, Erika Fraga, Agnelli Oliveira e Sérgio Pontes, que foram essenciais nos laboratórios;

À pesquisadora Ana Iraidy, por me ensinar a técnica de ultrassom;

À pesquisadora Leda, por toda calma e ajuda no meu pequeno acidente;

Às amigas que fiz nas Plantas, Nátili, Gabriela, Géssica, Aline, Thais, Isadora, Izabela, Yineth, Carol Beres, Thaisi, Flávia e Fabíola;

Às amigas da graduação, Andreza Santos, Alessandra Carvalho, Beatriz Luna e Ana Carolina, que além da faculdade, dividiu comigo todos os momentos do mestrado, tentando superar juntas os obstáculos que sempre aparecem;

A todos os amigos que se preocuparam comigo e deram suporte ao longo destes dois anos de mestrado;

Por fim, ao CNPq, por quase 2 anos de auxílio financeiro.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

O bagaço de uva é o principal resíduo da indústria vitivinícola e apresenta um alto teor de compostos fenólicos com potencial antioxidante. Diferentes técnicas têm sido utilizadas para extração e preservação destes compostos. Este trabalho teve como objetivo obter um extrato em pó rico em compostos fenólicos, a partir de bagaço de uva, utilizando os processos de extração assistida por ultrassom e microencapsulação por *spray drying*. O bagaço, obtido a partir da produção de espumante, foi seco, moído e submetido a extração hidroetanólica assistida por ultrassom. Avaliou-se a influência da potência (1000 a 3000 W/L), concentração de ácido cítrico (0 a 3%) e razão sólido: líquido (S:L) (1:5 a 1:15) sobre a recuperação de compostos fenólicos, incluindo as antocianinas, e atividade antioxidante. O extrato obtido nas melhores condições foi caracterizado por CLAE-DAD e microencapsulado por *spray drying*, utilizando como agentes encapsulantes misturas de maltodextrina 5DE com gelatina, com goma arábica e com isolado de proteína de soro de leite (1:1). Foram identificadas as seguintes substâncias: delphinidina-3-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo, malvidina-3-glicosídeo, ácido gálico, ácido protocatecuico, catequina, ácido vanílico, ácido sirínico, epicatequina, ácido p-cumárico, ácido elágico, rutina, miricetina, quercetina, kaempferol e isorhamnetina. Entre as condições avaliadas no planejamento experimental, as extrações mais eficientes ocorreram quando foram aplicadas maiores potências de ultrassom, maiores concentrações de ácido e maior volume de solução. O teor de antocianinas monoméricas presentes nos extratos obtidos por ultrassom variou de 453 ± 6 a 685 ± 11 mg malvidina-3-glicosídeo. 100 g^{-1} de bagaço; o teor de compostos fenólicos totais variou de 6.485 ± 40 a 11.732 ± 126 mg ácido gálico equivalente (AGE). 100 g^{-1} de bagaço; a atividade antioxidante pelas metodologias ORAC e ABTS variou de 230 ± 1 a 516 ± 17 $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$ e de 442 ± 37 a 939 ± 110 $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$, respectivamente. A condição mais adequada, dentro dos limites avaliados, foi de 3000 W/L de potência, 2,5% de ácido cítrico e uma razão S: L de 1:15. O ultrassom mostrou-se uma alternativa promissora para a extração de compostos antioxidantes do bagaço de uva. O processo por *spray drying* provou ser eficiente na microencapsulação e retenção de compostos fenólicos, incluindo as antocianinas, preservando-as de forma mais eficiente do que o extrato líquido.

ABSTRACT

Grape pomace is the main residue from the winemaking industry and has a high content of phenolic compounds with antioxidant potential. Different techniques have been used for extraction and preservation of these compounds. The objective of this work was to obtain a powdered extract rich in phenolic compounds, from grape pomace, using ultrasound-assisted extraction and microencapsulation by spray drying. Grape pomace, resulting from sparkling production, was dried, milled and subjected to hydroethanolic ultrasound-assisted extraction. The influence of ultrasound power (1000 to 3000 W/L), citric acid concentration (0 to 3%) and solid:liquid (S:L) ratio (1:5 to 1:15) on the phenolic compounds recovery, including anthocyanins, and on the antioxidant activity was evaluated. The extract obtained at the best conditions was characterized by HPLC-DAD and microencapsulated by spray drying using blends of maltodextrin 5DE with gelatin, arabic gum and whey protein isolate (1:1) as carrier agents. The following compounds have been identified: delphinidin-3-glycoside, cyanidin-3-glycoside, petunidin-3-glycoside, peonidin-3-glycoside, malvidin-3-glycoside, gallic acid, protocatechuic acid, catechin, vanillic acid, epicatechin, p-coumaric acid, ellagic acid, rutin, myricetin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin. Among the conditions evaluated in the experimental design, more efficient extractions have occurred when higher ultrasound potencies, acid concentrations and lower solid:liquid ratio were used. The most suitable condition, within the evaluated limits, was 3000 W/L of power, 2.5% of citric acid and a S:L ratio of 1:15. The monomeric anthocyanins content present in the extracts obtained by ultrasound ranged from 453 ± 6 to 685 ± 11 mg malvidin-3-glycoside. 100 g^{-1} of pomace; total phenolic compounds varied from $6,485 \pm 40$ to $11,732 \pm 126$ mg gallic acid equivalent (AGE) 100 g^{-1} bagasse; the antioxidant activity by ORAC and ABTS ranged from 230 ± 1 to 516 ± 17 $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$ and from 442 ± 37 to 939 ± 110 $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$, respectively. The ultrasound showed to be a promising alternative for extraction of antioxidant compounds from grape pomace. The *spray drying* process proved to be efficient in the microencapsulation and retention of phenolic compounds, including anthocyanins, preserving them more efficiently than the liquid extract.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| 1 - Vale do São Francisco e suas regiões hidrográficas | 21 |
| 2 - Cacho de uva da variedade Syrah | 22 |
| 3 - Esquema simplificado do processo de vinificação branca | 23 |
| 4 - Esquema da elaboração de espumante pelos métodos <i>Chapenoise</i> e <i>Charmat</i> | 24 |
| 5 - Estrutura de ácidos fenólicos derivados de ácidos benzoicos (A) e de ácidos cinâmicos (B)..... | 26 |
| 6 - Estrutura do núcleo fundamental dos flavonoides | 27 |
| 7 - Estrutura das subclasses de flavonoides (não-antociânicos)..... | 28 |
| 8 - Principais antocianinas encontradas em uvas..... | 30 |
| 9 - Estruturas moleculares em diferentes valores de pH. (AH ⁺) cátion flavílio; (A) base quinoidal; (B) carbinol ou pseudobase; e (C) chalcona..... | 32 |
| 10 - Degradação de antocianinas e formação de ácidos fenólicos | 34 |
| 11 - Esquema ilustrativo de um sistema cromatográfico líquido | 35 |
| 12 - Estabilização do radical ABTS ^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio | 38 |
| 13 - Fenômeno de cavitação | 41 |
| 14 - Esquema do <i>spray dryer</i> | 44 |
| 15 - Superfícies de resposta para antocianinas monoméricas nas condições: (a) 1,5% de ácido cítrico; (b) 2000 W/L; (c) S:L = 1:10 | 65 |
| 16 - Superfícies de resposta para fenólicos totais nas condições: (a) 1,5% de ácido cítrico; (b) 2000 W/L; (c) S:L = 1:10 | 67 |
| 17 - Diagrama de Pareto para avaliar o efeito dos fatores investigados sobre a atividade antioxidante medida pelo método ABTS | 69 |
| 18 - Superfícies de resposta para atividade antioxidante pelo método ORAC nas condições: (a) 1,5% de ácido cítrico; (b) 2000 W/L; (c) S:L = 1:10..... | 70 |
| 19 - Cromatograma das antocianinas monoméricas do bagaço de uva pelo método de Gouvêa et al. (2015), em 520 nm | 72 |
| 20 - Cromatograma das antocianinas monoméricas do bagaço de uva, em 520 nm | 72 |
| 21 - Espectros UV-Vis das antocianinas identificadas, a partir de padrões, nas amostras.. | 73 |
| 22 - Espectro de massa acurada da antocianina isolada referente ao pico 16 | 74 |
| 23 - Espectro UV-Vis da antocianina isolada referente ao pico 16..... | 74 |
| 24 - Espectro de massa acurada da antocianina isolada referente ao pico 17 | 74 |
| 25 - Espectro UV-Vis da antocianina isolada referente ao pico 17..... | 75 |
| 26 - Cromatograma das antocianinas monoméricas do extrato hidroetanólico obtido a partir do bagaço de uva..... | 76 |
| 27 - Cromatograma da fração de ácidos fenólicos e flavonoides livres, do bagaço de uva, em 270 nm, com zoom nos picos de interesse..... | 79 |
| 28 - Cromatograma da fração de ácidos fenólicos e flavonoides livres, do bagaço de uva, em 310 nm | 79 |
| 29 - Cromatograma da fração de ácidos fenólicos e flavonoides livres, do bagaço de uva, em 370 nm | 80 |
| 30 - Cromatograma da fração de ácidos fenólicos e flavonoides após hidrólises, do bagaço de uva, em 270 nm | 80 |
| 31 - Cromatograma da fração de ácidos fenólicos e flavonoides após hidrólises, do bagaço de uva, em 310 nm | 80 |
| 32 - Cromatograma da fração de ácidos fenólicos e flavonoides após hidrólises, do bagaço de uva, em 370 nm | 81 |
| 33 - Espectros UV-Vis dos ácidos fenólicos e flavonoides identificados nas amostras..... | 81 |
| 34 - Espectros UV-Vis dos ácidos fenólicos e flavonoides identificados nas amostras..... | 82 |

| | |
|--|----|
| 35 - Cromatograma da fração de ácidos fenólicos e flavonoides do extrato ultrassônico, em 270 nm | 83 |
| 36 - Cromatograma da fração de ácidos fenólicos e flavonoides do extrato ultrassônico, em 310 nm | 83 |
| 37 - Cromatograma da fração de ácidos fenólicos e flavonoides do extrato ultrassônico, em 370 nm | 84 |
| 38 - Atividade antioxidante, por ABTS e ORAC, dos extratos microencapsulados por <i>spray drying</i> | 91 |
| 39 - Distribuição do tamanho de partículas do pó produzidos com maltodextrina (MD); maltodextrina e gelatina (MD+GE); maltodextrina e goma arábica (MD + GA); maltodextrina e isolado proteico de soro de leite (MD + WPI) | 92 |
| 40 - Imagens das partículas resultantes da microencapsulação do extrato de bagaço de uva com os diferentes agentes encapsulantes | 94 |
| 41 - Extrato microencapsulado com maltodextrina (MD), maltodextrina e goma arábica (MD+GA), maltodextrina e gelatina (MD+GE) e maltodextrina e isolado proteico de soro de leite (MD+WPI) | 95 |
| 42 - Antocianinas monoméricas obtidas no extrato líquido (a) e nos microencapsulados por <i>spray drying</i> (b), armazenados a 40°C | 96 |
| 43 - Fenólicos totais obtidas no extrato líquido (a) e nos microencapsulados por <i>spray drying</i> (b), armazenados a 40°C | 97 |
| 44 - Atividade antioxidante por ABTS obtidas no extrato líquido (a) e nos microencapsulados por <i>spray drying</i> (b), armazenados a 40°C | 98 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| 1 - Diferentes antocianinas denominadas de acordo com seus radicais | 31 |
| 2 - Condições do delineamento composto central rotacional | 48 |
| 3 - Condições de extração dos 17 ensaios do planejamento experimental..... | 49 |
| 4 - Gradiente de eluição da fase móvel para separação de ácidos fenólicos e flavonoides. | 56 |
| 5 - Equações da reta e coeficientes de determinação das curvas analíticas..... | 57 |
| 6 - Gradiente de eluição da fase móvel para separação de antocianinas | 58 |
| 7 - Antocianinas monoméricas (AM), compostos fenólicos totais (AT), atividade antioxidante por ORAC e ABTS dos extratos obtidos nas diferentes condições do planejamento experimental..... | 63 |
| 8 - Identificação e quantificação de antocianinas monoméricas presentes no bagaço de uva Syrah e no extrato obtido por ultrassom | 77 |
| 9 - Teores de ácidos fenólicos e flavonoides ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$) presentes no bagaço de uva Syrah e no extrato obtido por ultrassom..... | 85 |
| 10 - Umidade das amostras microencapsuladas com diferentes agentes encapsulantes | 87 |
| 11 - Antocianinas monoméricas, retenção das antocianinas, compostos fenólicos totais e retenção de fenólicos das amostras microencapsuladas com diferentes agentes encapsulantes..... | 88 |
| 12 - Variação do diâmetro médio dos extratos microencapsulados, span e diâmetro das partículas | 92 |
| 13 - Análise de variância (ANOVA) do modelo ajustado para a análise de antocianinas monoméricas dos extratos do planejamento experimental..... | 117 |
| 14 - Análise de variância (ANOVA) do modelo ajustado para a análise de fenólicos totais dos extratos do planejamento experimental..... | 117 |
| 15 - Análise de variância (ANOVA) do modelo ajustado para a análise de atividade antioxidante por ORAC dos extratos do planejamento experimental | 118 |
| 16 - Análise de variância (ANOVA) do modelo ajustado para a análise de atividade antioxidante por ABTS dos extratos do planejamento experimental | 118 |

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ϵ - absorvidade molar
Abs - Absorbância
C₁₈ - Fase estacionária reversa octadecilslica
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD - arranjo de fotodiodo
HPLC - High Performance Liquid Chromatography
NaOH - Hidróxido de sódio
UV-Vis - ultravioleta e visível
V - volume
v/v - volume por volume
m/m - massa por massa
EM - espectrometria de massas
PM - peso molecular
FD - fator de diluição
MD - maltodextrina
GA - goma arábica
GE - gelatina
WPI - isolado proteico de soro de leite
FE - fase estacionária
FM - fase móvel
ABTS - 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AAPH Dicloridrato de 2,2,azobis (2-metilpropionamida)
ORAC *Oxygen Radical Antioxidant Capacity*
mg - micrograma
mL - microlitro
g - grama
L - litro
AM - antocianinas monoméricas
FT - fenólicos totais
HCl - cido clorídrico
K₂SO₅ - persulfato de potássio
rpm - rotações por minuto
nm - nanmetro
M - molar
min - minuto
W - watts
ESI - electrospray ionization
kV - quilovolt
OH - hidroxila
MEV - microscopia eletrônica de varredura
AUC - rea under curve
AGE - cido gálico equivalente
t_R - tempo de retenção
MHz - megahertz

kHz - quilohertz

S:L - sólido:líquido

% - por cento

US - ultrassom

DE - dextrose equivalente

R² - coeficiente de determinação

P - peso

Q-TOF - Quadropole time of flight

μ - micro

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 - INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 - OBJETIVOS | 19 |
| 2.1 - Objetivo Geral | 19 |
| 2.2 - Objetivos Específicos | 19 |
| 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 20 |
| 3.1 - Uva e a indústria vitivinícola | 20 |
| 3.2 - O bagaço de uva | 24 |
| 3.3 - Caracterização química | 25 |
| 3.3.1 - Ácidos fenólicos | 26 |
| 3.3.2 - Flavonoides | 27 |
| 3.3.3 - Antocianinas | 29 |
| 3.3.4 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência | 34 |
| 3.3.5 - Atividade Antioxidante | 36 |
| 3.4 - Métodos de extração de compostos bioativos | 39 |
| 3.5 - Extração assistida por Ultrassom | 41 |
| 3.6 - Microencapsulação por <i>spray drying</i> | 43 |
| 4 - MATERIAL E MÉTODOS | 47 |
| 4.1 - Material | 47 |
| 4.2 - Preparo da amostra | 47 |
| 4.3 - Extração dos compostos fenólicos | 47 |
| 4.4 - Microencapsulação dos extratos por <i>spray drying</i> | 49 |
| 4.5 - Métodos analíticos | 50 |
| 4.5.1 - Análise de antocianinas monoméricas por pH diferencial | 50 |
| 4.5.2 - Análise de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu | 51 |
| 4.5.3 - Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS | 52 |
| 4.5.4 - Determinação da atividade antioxidante pelo método ORAC | 53 |
| 4.5.5 - Análise de ácidos fenólicos e flavonoides não antociânicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) | 54 |
| 4.5.5.1 - Condições cromatográficas para determinação de ácidos fenólicos e flavonoides não antociânicos por CLAE-DAD | 55 |
| 4.5.5.2 - Quantificação dos ácidos fenólicos e flavonoides não antociânicos | 56 |
| 4.5.6 - Análise de antocianinas monoméricas por CLAE-DAD | 57 |

| | |
|--|-----|
| 4.5.6.1 - Condições cromatográficas para determinação de antocianinas monoméricas por CLAE-DAD | 58 |
| 4.5.6.2 - Cálculo da concentração de cada antocianina na amostra..... | 59 |
| 4.5.6.3 - Isolamento e identificação das antocianinas de interesse..... | 59 |
| 4.5.7 - Análise estatística..... | 60 |
| 4.6 - Caracterização dos extratos microencapsulados | 60 |
| 4.6.1 - Sólidos totais e Umidade..... | 60 |
| 4.6.2 - Distribuição do tamanho de partícula..... | 61 |
| 4.6.3 - Morfologia das partículas..... | 61 |
| 4.7 - Estabilidade dos extratos microencapsulados | 61 |
| 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO | 63 |
| 5.1 - Extração por ultrassom..... | 63 |
| 5.1.1 - Antocianinas monoméricas | 64 |
| 5.1.2 - Compostos fenólicos totais | 66 |
| 5.1.3 - Atividade Antioxidante | 68 |
| 5.1.4 - Seleção da melhor condição de extração..... | 70 |
| 5.2 - Caracterização por CLAE-DAD | 71 |
| 5.2.1 - Antocianinas monoméricas por CLAE-DAD | 71 |
| 5.2.2 - Ácidos fenólicos e flavonoides por CLAE-DAD..... | 78 |
| 5.3 - Microencapsulação do extrato..... | 87 |
| 5.3.1 - Caracterização físico-química e morfológica..... | 87 |
| 5.3.1.1 - Umidade | 87 |
| 5.3.1.2 – Compostos fenólicos totais e antocianinas | 88 |
| 5.3.1.3 – Atividade antioxidante..... | 90 |
| 5.3.1.4 - Distribuição do tamanho de partículas..... | 91 |
| 5.3.1.5 - Morfologia..... | 93 |
| 5.3.2 - Estabilidade à estocagem | 95 |
| 6 - CONCLUSÕES..... | 101 |
| 7 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 102 |
| 8 - PUBLICAÇÕES | 103 |
| 9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 104 |
| 10 - ANEXOS..... | 117 |

1. INTRODUÇÃO

A produção brasileira de uva se concentra majoritariamente no Sul do país, principalmente no Rio Grande do Sul. Contudo, nas últimas décadas esta produção tem se expandido para outras regiões, como o Vale do Rio São Francisco (CAMARGO et al., 2010), uma vez que algumas variedades de uva se adaptam bem a climas quentes, como é o caso da Syrah, variedade da espécie *Vitis vinifera*. Sua produção torna-se favorável nas regiões do Semiárido brasileiro, produzindo uvas e vinhos durante todo o ano (GUERRA et al., 2009).

Diversos resíduos são gerados na produção de vinhos, como sarro, borra, engaço, bagaço, entre outros, resultando em toneladas de resíduos sólidos. O bagaço é o principal tipo de resíduo, representando cerca de 20% do peso da uva processada (KAMMERER et al., 2004).

O bagaço de uva possui um alto teor de compostos fenólicos, tais como antocianinas, ácidos fenólicos, flavonoides não antociânicos e estilbenos, uma vez que durante a vinificação ocorre uma extração apenas parcial destes compostos. Dessa forma, a extração dessas substâncias representa uma alternativa para a obtenção de produtos com alto valor agregado, que podem ser utilizados como ingredientes funcionais ou corantes naturais nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica (BAYDAR et al., 2007; FONTANA et al., 2013).

Métodos de extração convencionais (extração em leito agitado) e não convencionais (extração assistida por ultrassom, com fluido supercrítico, assistida por micro-ondas, acelerada por solvente) vêm sendo utilizados para extrair substâncias bioativas de resíduos vegetais, sendo os métodos não convencionais reconhecidos pelo menor tempo de extração e maior rendimento (WANG e WELLER, 2006).

A maior eficiência na extração assistida por ultrassom tem sido atribuída principalmente às forças de cavitação resultantes do ultrassom, que envolvem a implosão de bolhas formadas no meio líquido durante sua aplicação. Essa implosão gera rápida compressão adiabática dos gases e vapores dentro das bolhas ou cavidades e, como consequência, altas temperaturas e pressões são produzidas, resultando em uma melhor extração (GONZÁLEZ-CENTENO et al., 2014).

Os compostos fenólicos são conhecidos por suas propriedades antioxidantes, porém alguns, como as antocianinas, são sensíveis a fatores como altas temperaturas,

exposição à luz e ao gás oxigênio (O₂), pH, entre outros. Nesse sentido, a microencapsulação destaca-se como uma alternativa de proteção a estes compostos, visando aumentar sua estabilidade e vida útil dos produtos. A microencapsulação por *spray drying* é o método mais comumente utilizado na indústria de alimentos, resultando em produtos em pó, geralmente bastante estáveis ao armazenamento (DESAI e PARK, 2005; CELLI et al., 2015).

Diante do exposto, este trabalho visou à obtenção de um extrato em pó rico em compostos fenólicos, a partir do bagaço de uva, coproduto do processamento da uva Syrah para obtenção de vinho branco, utilizando-se os processos de extração assistida por ultrassom e microencapsulação por *spray drying*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral obter um extrato em pó rico em compostos fenólicos, a partir do bagaço de uva, utilizando-se os processos de extração assistida por ultrassom e microencapsulação por *spray drying*.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a influência da potência do ultrassom, concentração de ácido cítrico e razão sólido:líquido na extração hidroetanólica de compostos fenólicos do bagaço de uva;
- Caracterizar os extratos obtidos em relação ao teor de fenólicos totais, antocianinas e capacidade antioxidante;
- Avaliar o perfil de fenólicos do bagaço de uva e do extrato obtido na melhor condição;
- Microencapsular, por *spray drying*, o extrato obtido na melhor condição de extração, utilizando como agentes encapsulantes maltodextrina, gelatina, goma arábica e isolado proteico de soro de leite;
- Caracterizar as partículas obtidas em relação ao teor de fenólicos totais, antocianinas, capacidade antioxidante, umidade, distribuição do tamanho de partículas e morfologia;
- Avaliar a estabilidade do extrato líquido e dos extratos encapsulados, em relação ao teor de fenólicos totais, antocianinas e capacidade antioxidante.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Uva e indústria vitivinícola

A uva é uma das frutas mais cultivadas no mundo, com 75 milhões de toneladas produzidas ao ano (FAO-OIV, 2016). Fruto da videira, a *Vitis vinifera* tem por principais destinos a produção de vinhos, sucos e consumo *in natura*. Sua produção no Brasil atingiu cerca de 1,5 milhões de toneladas no ano de 2015, sendo 52% da produção nacional destinadas ao processamento (DE MELLO, 2015).

Embora algumas tentativas de cultivar *Vitis vinifera* no solo brasileiro tenham sido feitas desde o século XVI, a vinificação teve seu início no Brasil com a imigração italiana, no final do século XIX. Parte desses imigrantes se estabeleceram na Serra Gaúcha e, como o vinho era considerado parte da cultura italiana, iniciou-se a fabricação de vinho na região (CAVALVANTE, 2016).

A expansão da produção de vinhos finos para outras regiões consiste em uma estratégia de mercado na exploração de novos territórios e também na busca por custos mais baixos de produção. Exemplos desta estratégia aplicada nas últimas décadas são as regiões de Mato Grosso, de Goiás e do Vale do Rio São Francisco, que, devido ao clima, possibilitam a produção de uvas e de vinhos durante todo o ano (GUERRA et al., 2009; CAMARGO et al., 2010; CAVALVANTE, 2016).

Uma vez que algumas variedades de uva se adaptam bem a climas quentes, como é o caso da Syrah, uma variedade da espécie *Vitis vinifera* L., a produção destas torna-se viável nas regiões do Semiárido brasileiro. Desta forma, devido ao ótimo desempenho dos vinhedos na região do semiárido, houve expansão da vitivinicultura no Submédio do Vale do São Francisco, a partir da década de 80 (Figura 1). Nesse sentido, a partir da década de 80, o excelente desempenho dos vinhedos do Semiárido nordestino consolidou o Submédio do Vale do São Francisco como uma nova fronteira para expansão da vitivinicultura. Desde então, a atividade vitivinícola vem contribuindo para a ampliação e o fortalecimento das oportunidades econômicas nessa região, com safras cada vez maiores e uvas de excelente qualidade para a produção de vinhos, sucos e outros derivados, tendo por destaque a produção de uvas de mesa, gerando renda para milhares de famílias (GUERRA et al., 2009; SOARES e LEÃO, 2009; DE MELLO, 2015).

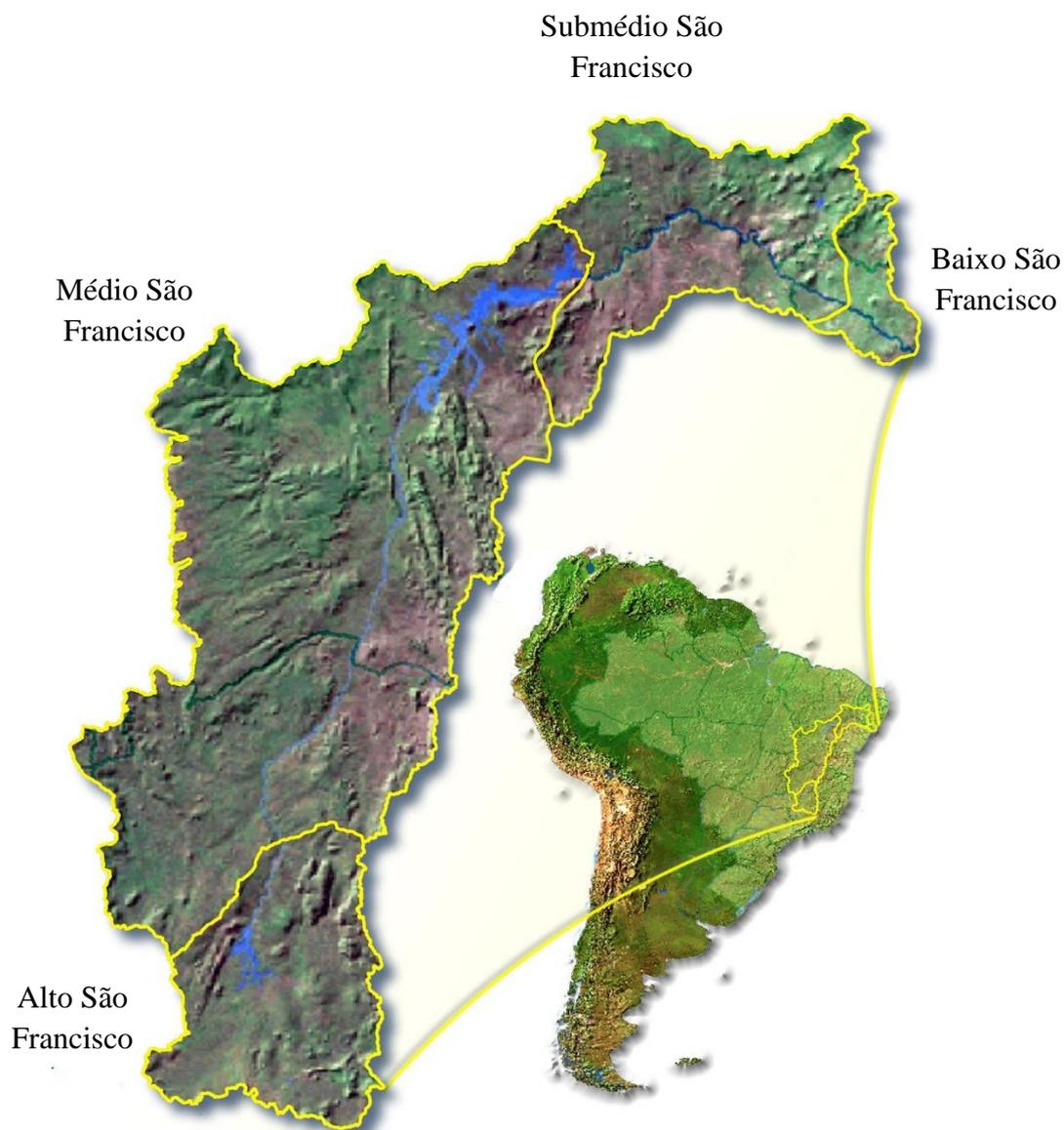


Figura 1: Vale do São Francisco e suas regiões hidrográficas.
Fonte: Adaptado de MMA (2006).

A uva Syrah (Figura 2), sinônimo Shiraz (Austrália), é uma uva tinta, com cor roxa intensa. Seu cacho é alongado, com pequenas bagas redondas ou ovais. Esta variedade foi originada de um cruzamento entre as uvas Dureza e Mondeuse Blanche. O cultivo da Syrah ganhou força na França e hoje ela pode ser encontrada em diversos países, estando entre as 10 variedades mais cultivadas no mundo. Dependendo do tipo de clima onde é cultivada, esta variedade pode originar vinhos com perfis aromáticos distintos. Em climas mais quentes, os vinhos produzidos são encorpados, tendo por características notas que lembram ameixa e chocolate (JACKSON, 2008; GUERRA et al., 2009; OLIVEIRA, 2010; OIV FOCUS, 2017; MISTRAL, 2017).



Figura 2: Cacho de uva da variedade Syrah.
Fonte: Covinca (2017).

O vinho, de acordo com definição da RES N° 45/96, “é exclusivamente a bebida que resulta da fermentação alcoólica completa ou parcial da uva fresca, esmagada ou não, ou do mosto simples ou virgem, com um conteúdo de álcool adquirido mínimo de 7% (v/v a 20°C)” (MERCOSUL, 1996).

A fermentação alcoólica é a principal diferença entre os processos da vinificação tinta e branca. Na produção de vinhos tintos as bagas esmagadas seguem para a fermentação juntamente com o mosto, no qual as leveduras adicionadas transformarão os açúcares em etanol e subprodutos, podendo durar de 4 a 6 dias. Na vinificação branca o bagaço é removido logo após o esmagamento, para então haver a fermentação (GUERRA et al., 2009). Portanto, para a obtenção de vinho branco, as uvas são processadas sem suas cascas, diferentemente da produção de vinho tinto (ANTONIOLLI et al., 2015). Desta forma, na produção de vinho branco podem ser utilizadas tanto uvas brancas, quanto uvas tintas, já que a retirada das cascas evita a passagem da coloração para o mosto (RIZZON e DALL’AGNOL, 2009). O processo de vinificação branca está apresentado, resumidamente, no esquema da Figura 3.

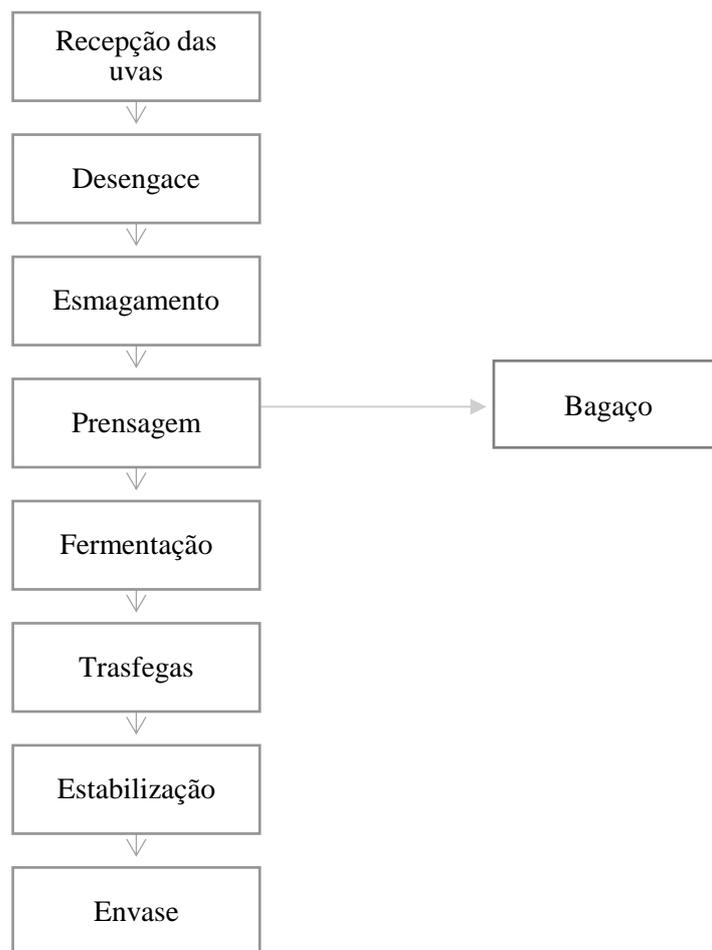


Figura 3: Esquema simplificado do processo de vinificação branca.
Fonte: Adaptado de Venturini Filho (2005).

Os espumantes são obtidos após duas fermentações, sendo a primeira uma fermentação comum, realizada para obter-se um vinho normalmente branco, denominado vinho base. A segunda pode ser executada de duas formas: na própria garrafa, chamado de método *Champenoise* (também chamado de tradicional, clássico ou fermentação na garrafa) ou em grandes recipientes resistentes à pressão, denominados autoclaves, método chamado de *Charmat* (GUERRA et al., 2009; SIMONAGGIO e LEHN, 2014). Ambos os métodos estão apresentados nos esquemas da Figura 4.

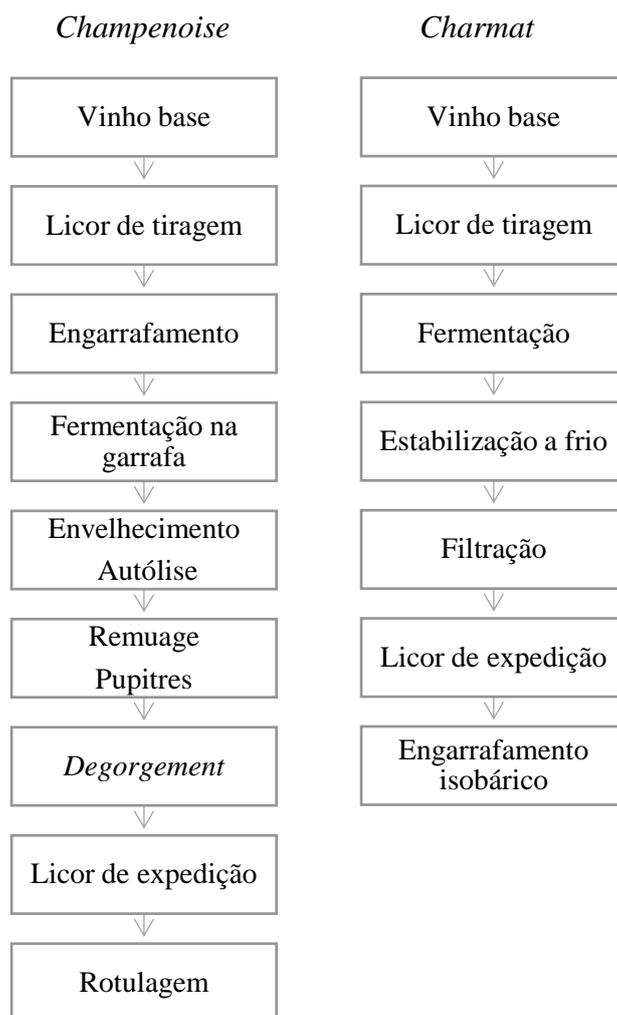


Figura 4: Esquema da elaboração de espumante pelos métodos *Champenoise* e *Charmat*.
Fonte: Simonaggio e Lehn (2014).

3.2. O bagaço de uva

Com o processamento de vinho grandes quantidades de resíduos são geradas por ano, como o bagaço (constituído de casca, semente e engaço), que representa cerca de 20% do volume processado (KAMMERER et al., 2004).

O resíduo da vinificação comumente é destinado ao uso como fertilizante e alimentação animal. Contudo, o uso como fertilizante pode trazer problemas, pois altos níveis de compostos fenólicos podem inibir a germinação de sementes, devido a sua fitotoxicidade e efeitos antimicrobianos. Já como alimentação animal também podem ser prejudiciais, pois alguns animais têm intolerância a certos componentes do resíduo, como a presença de ligninas, que diminuem a digestibilidade por reduzirem enzimas celulolíticas e proteolíticas (RUBERTO et al., 2007; GONZÁLEZ-CENTENO et al., 2012; FONTANA et al., 2013).

O bagaço de uva é caracterizado por apresentar um alto teor de compostos fenólicos, que são diferentes de acordo com a variedade da uva, condições ambientais e de cultivo. Entre os compostos, são observados principalmente antocianinas, ácidos fenólicos, flavonoides não antociânicos e estilbenos, já que durante a vinificação ocorre uma extração apenas parcial destes compostos (KAMMERER et al., 2004; ROCKENBACH et al., 2007; FONTANA et al., 2013; FLAMINI et al., 2013).

Estas substâncias têm conhecido efeito antioxidante, promovendo benefícios à saúde, com potencial aplicação, por exemplo, em indústrias farmacêuticas, cosméticas e de alimentos, por exemplo. A elevada concentração de antocianinas representa um grande potencial de utilização para estes coprodutos como corantes naturais. O uso do bagaço de uva como fonte de antioxidantes também pode contribuir para a geração de ingredientes e produtos com alto valor agregado (BAYDAR et al., 2007; FLAMINI et al., 2013; SESSA et al., 2013).

3.3. Caracterização Química

Para viver, crescer e se reproduzir, todo ser vivo precisa transformar e interconverter uma série de compostos orgânicos. Nas plantas, seu metabolismo fornece substâncias responsáveis por estas funções, sendo estas distinguidas como metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são responsáveis pelo crescimento, desenvolvimento e reprodução das plantas, enquanto os secundários têm por função defender o organismo de certos predadores, atrair polinizadores liberando odores atrativos e até mesmo com sua coloração. Estes últimos são destacados pelas suas atividades biológicas diversas, o que confere aos produtos naturais o reconhecimento como substâncias bioativas (DEWICK, 2002; ALI et al., 2010).

Dentre os metabólitos secundários encontrados em vegetais estão os compostos fenólicos, o ácido ascórbico e os carotenoides. Os compostos fenólicos, como ácidos fenólicos, flavonoides (incluindo as antocianinas), têm por característica possuírem ao menos um anel aromático e um grupamento hidroxila, substituindo um átomo de hidrogênio (ANGELO e JORGE, 2007).

Uma vez que os animais não são capazes de sintetizar anéis aromáticos, é necessário o consumo de vegetais contendo compostos fenólicos na dieta, visto que podem contribuir significativamente para a saúde humana, como é sugerido por

inúmeros estudos científicos (NIJVELDT et al., 2001; NACZK e SHAHIDI, 2004; YILMAZ e TOLEDO, 2004).

3.3.1. Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são metabólitos secundários usualmente encontrados em alimentos de origem vegetal e podem ser divididos em dois grupos. O primeiro é composto pelos derivados dos ácidos benzóicos, com sete átomos de carbono (C6-C1), sendo os mais simples encontrados na natureza, podendo ser encontrados na forma de glicosídeos. Os ácidos gálico e protocatecuico são exemplos deste grupo (Figura 5A). O outro grupo é formado pelos derivados de ácidos cinâmicos, com nove átomos de carbono (C6-C3), sendo estes predominantes em plantas, como os ácidos p-cumárico, cafeico e ferúlico (Figura 5B) (HERRMANN e NAGEL, 1989; SOARES, 2002; MATTILA e HELLSTRÖM, 2007; TSAO, 2010).

Os ácidos fenólicos possuem um grupamento carboxílico e uma ou mais hidroxilas em seus anéis aromáticos, podendo se apresentar em sua forma natural ou ligados entre si ou com outros compostos. Em alimentos, os ácidos presentes neste segundo grupo estão comumente ligados a ácidos quínicos ou glicosilados (HERRMANN e NAGEL, 1989; MATTILA e KUMPULAINEN, 2002; NEO et al., 2010).

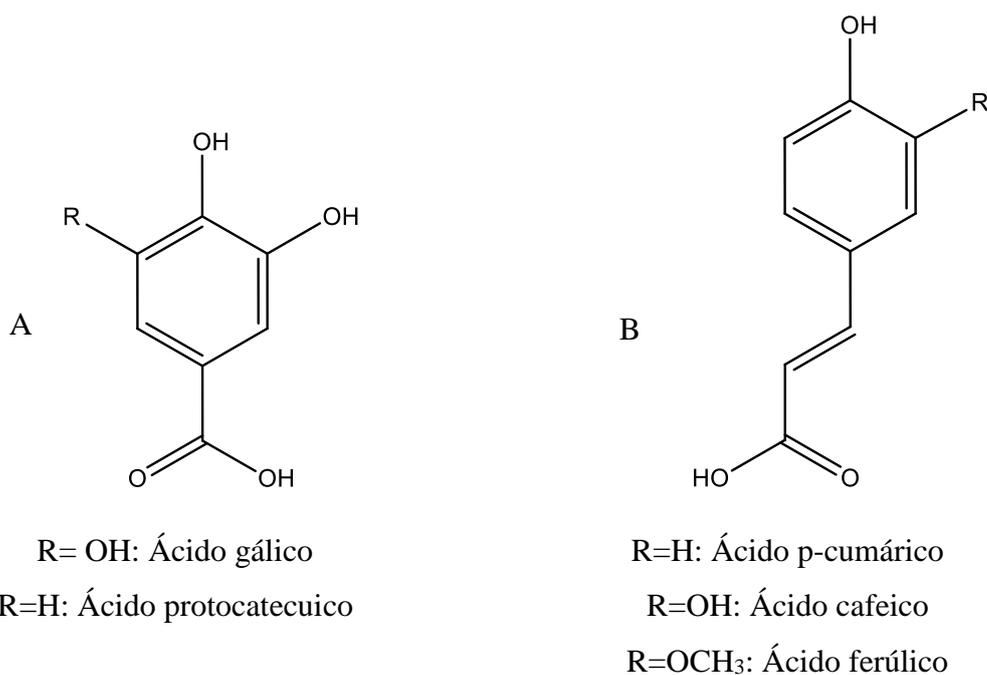


Figura 5: Estruturas de ácidos fenólicos derivados de ácidos benzoicos (A) e de ácidos cinâmicos (B).

3.3.2. Flavonoides

Os flavonoides são compostos fenólicos importantes e diversificados. Sua presença no reino vegetal é vasta, podendo ser encontrados em frutas, hortaliças, grãos, cascas, raízes, caules, flores, chá e vinho, dentre outros. Alguns flavonoides são pigmentos coloridos que conferem cor a muitas frutas e hortaliças, mas a maioria destas substâncias são incolores. Além disso, exercem função de proteção do organismo, por exemplo, quanto a danos produzidos por agentes oxidantes como os raios ultravioletas, poluição ambiental, substâncias químicas presentes nos alimentos e estresse (NIJVELDT et al., 2001; YILMAZ e TOLEDO, 2004; VOLP et al., 2008; COUTINHO et al., 2009).

Geralmente, os flavonoides são classificados como fenólicos devido à sua estrutura química (Figura 6), que apresenta um núcleo característico C6-C3-C6, com dois anéis aromáticos ligados por uma cadeia de três átomos de carbono, que formam um heterociclo oxigenado. Estes são biossintetizados a partir das vias do ácido chiquímico e do ácido acético, conduzindo à formação de várias classes de metabólitos, que se diferem pelo grau de oxidação e padrão de substituição do anel C. Dentro de uma classe fitoquímica de flavonoides, os compostos diferem no padrão de substituição dos anéis A e B. Estas subclasses são divididas em: flavonas, flavanonas, flavanóis (catequina), flavononois, isoflavonas, flavonóis e antocianinas (Figura 7) (PIETTA, 2000; YILMAZ e TOLEDO, 2004; DAMODARAN et al., 2010; FLAMINI et al., 2013).

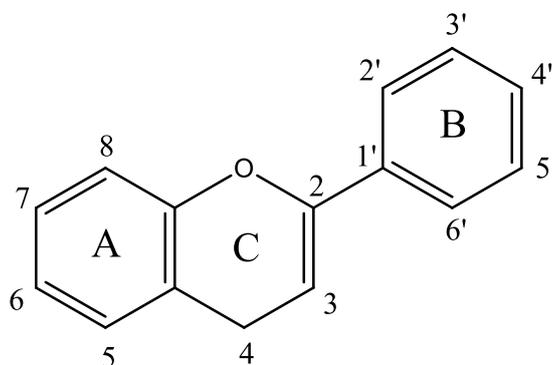


Figura 6: Estrutura do núcleo fundamental dos flavonoides.

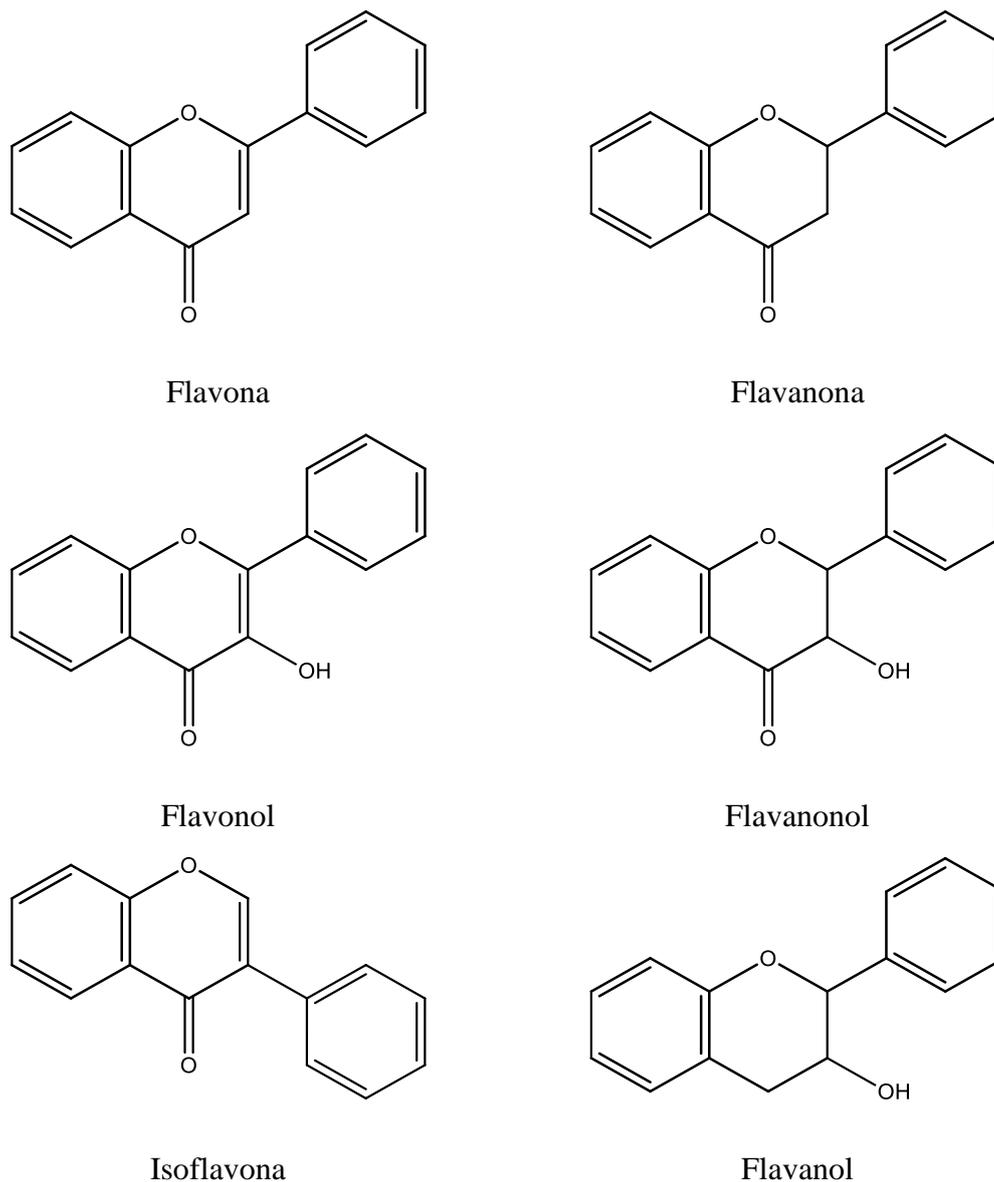


Figura 7: Estruturas das subclasses de flavonoides (não-antociânicos).

Os flavonoides podem ser encontrados como agliconas ou sob a forma de glicosídeos e/ou derivados metilados e/ou acilados. Sua atividade biológica depende tanto de sua diferença estrutural, quanto dos padrões de glicosilação. Um efeito importante dos flavonoides é a captura de radicais livres derivados de oxigênio. Estudos experimentais *in vitro* também mostraram que os flavonoides possuem propriedades anti-inflamatórias, antialérgicas, antivirais e anticancerígenas (NIJVELDT et al., 2001; COUTINHO et al., 2009; TSAO, 2010).

3.3.3. Antocianinas

O emprego de corantes nas indústrias é uma prática comum, uma vez que cor e aparência dos produtos são importantes para aceitação pelo consumidor. Com a busca crescente dos consumidores por produtos mais saudáveis, existe um interesse considerável em fontes alternativas de pigmentos que possam ser utilizados como corantes naturais, com capacidade de ocupar um papel de destaque na composição de produtos, como é o caso das antocianinas (GIUSTI et al., 1999; LOPES et al., 2007).

As antocianinas (do grego *anthos* = flor e *kianos* = azul) são pigmentos hidrossolúveis originados da subclasse antocianidinas, quando estas apresentam radicais glicosídeos. Elas têm como estrutura básica o cátion 2-fenilbenzopirílio, também denominado cátion flavílio (LOPES et al., 2007; VOLP et al., 2008; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

São os pigmentos mais importantes das plantas, apresentando tonalidades de laranja, rosa, vermelho, violeta e azul. São amplamente distribuídas em frutas, como o açaí, a jabuticaba, o jamelão, o jambo e o morango, mas também encontradas em flores e outros materiais vegetais. As antocianinas são sintetizadas a partir de antocianidinas por glicosilação nas posições 3 e 5 do anel C, contudo a observação da molécula na forma livre, isto é, a aglicona, é rara no reino vegetal. As antocianidinas glicosiladas são geralmente mais estáveis do que as agliconas correspondentes, uma vez que a glicosilação induz a ligação intramolecular de hidrogênio dentro da molécula de antocianina. Elas se diferem pelo número de grupos hidroxil e/ou metoxil e número de glicosídeos ligados a elas. As antocianinas de ocorrência natural mais comuns são as moléculas de 3-O-glicosídeos e os 3,5-O-diglicosídeos de malvidina, cianidina, pelargonidina, delphinidina, petunidina e peonidina (FLESCHHUT et al., 2006; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; FLAMINI et al., 2013).

Além da presença de glicosídeos na molécula, as antocianinas também podem estar aciladas, ou seja, com ligações a outros grupos orgânicos, como ácidos fenólicos (ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico, gálico ou p-hidroxibenzóico) e/ou ácidos alifáticos (ácidos malônico, acético, málico, succínico ou oxálico), ligações comumente observadas na maioria das antocianinas de uvas vermelhas. Estes substituintes acilados são geralmente ligados ao açúcar C3, esterificados ao grupo 6-OH ou menos frequentemente ao grupo 4-OH dos açúcares. A glicosilação nas posições C3 e C5 da molécula afeta a cor percebida do pigmento, sendo os derivados 3-glicosídeos são mais

intensamente coloridos do que os 3,5-diglicosídeos. A variação estrutural da antocianina, incluindo a substituição do açúcar, a hidroxilação e a metoxilação do anel B, e a presença de grupos acilados estão correlacionadas com a estabilidade do pigmento (GIUSTI et al., 1999; GIUSTI e WROLSTAD, 2003; FLAMINI et al., 2013).

Em uvas, diversas antocianinas já foram identificadas, sendo as principais delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina (majoritária nas uvas), presentes como derivados de glicosídeos, acetilglicosídeos e p-cumarilglicosídeos. A estrutura básica de algumas antocianinas presentes em uvas está demonstrada na Figura 8. A Tabela 1 apresenta diferentes tipos de antocianinas, denominadas de acordo com seus radicais (FLAMINI et al., 2013; FRAIGE et al., 2014).

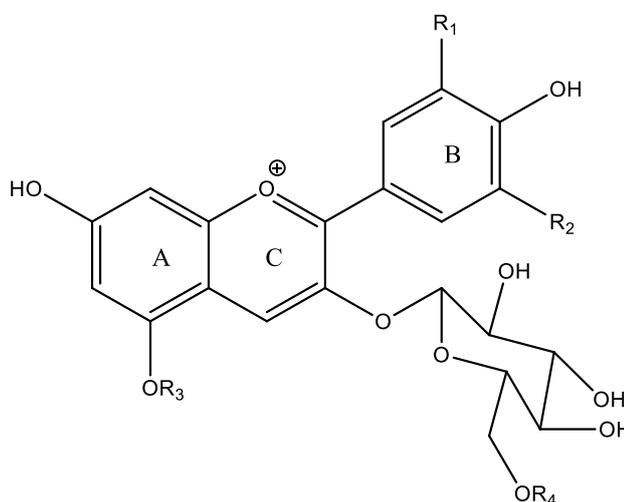


Figura 8: Principais antocianinas encontradas em uvas. R₁, R₂, R₃ e R₄ estão descritos na Tabela 1.
Fonte: Fraige et al. (2014).

Tabela 1: Diferentes antocianinas denominadas de acordo com seus radicais

| Antocianina | R1 | R2 | R3 | R4 |
|--|------------------|------------------|-----------|-------------------|
| Delfinidina 3,5- <i>O</i> -diglicosídeo | OH | OH | Gli | H |
| Delfinidina 3- <i>O</i> -glicosídeo | OH | OH | H | H |
| Petunidina 3,5- <i>O</i> -diglicosídeo | OCH ₃ | OH | Gli | H |
| Peonidina 3,5- <i>O</i> -diglicosídeo | OCH ₃ | H | Gli | H |
| Cianidina 3- <i>O</i> -glicosídeo | OH | H | H | H |
| Malvidina 3,5- <i>O</i> -diglicosídeo | OCH ₃ | OCH ₃ | Gli | H |
| Petunidina 3- <i>O</i> -glicosídeo | OCH ₃ | OH | H | H |
| Peonidina 3- <i>O</i> -glicosídeo | OCH ₃ | H | H | H |
| Malvidina 3- <i>O</i> -glicosídeo | OCH ₃ | OCH ₃ | H | H |
| Delfinidina 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acetil) glicosídeo | OH | OH | H | acetil |
| Malvidina 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acetil)-5- <i>O</i> -diglicosídeo | OCH ₃ | OCH ₃ | Gli | acetil |
| Petunidina 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acetil) glicosídeo | OCH ₃ | OH | H | acetil |
| Delfinidina 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaril) glicosídeo | OH | OH | H | <i>p</i> -cumaril |
| Peonidina 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acetil) glicosídeo | OCH ₃ | H | H | acetil |
| Malvidina 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acetil) glicosídeo | OCH ₃ | OCH ₃ | H | acetil |
| Malvidina 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaril)-5- <i>O</i> -diglicosídeo | OCH ₃ | OCH ₃ | Gli | <i>p</i> -cumaril |
| Cianidina 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaril) glicosídeo | OH | H | H | <i>p</i> -cumaril |
| Petunidina 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaril) glicosídeo | OCH ₃ | OH | H | <i>p</i> -cumaril |
| Peonidin 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaril) glicosídeo | OCH ₃ | H | H | <i>p</i> -cumaril |
| Malvidin 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaryl) glicosídeo | OCH ₃ | OCH ₃ | H | <i>p</i> -cumaril |

Fonte: Fraige et al. (2014).

Quando em meio aquoso, as antocianinas podem apresentar diferentes estruturas químicas em equilíbrio: cátion flavílio (vermelho), base anidra quinoidal (azul), pseudo-base carbitol (incolor), e chalcona (incolor ou levemente amarela) (Figura 9) (TIMBERLAKE, 1980; BAŁKOWSKA-BARCZAK, 2005; LOPES et al., 2007).

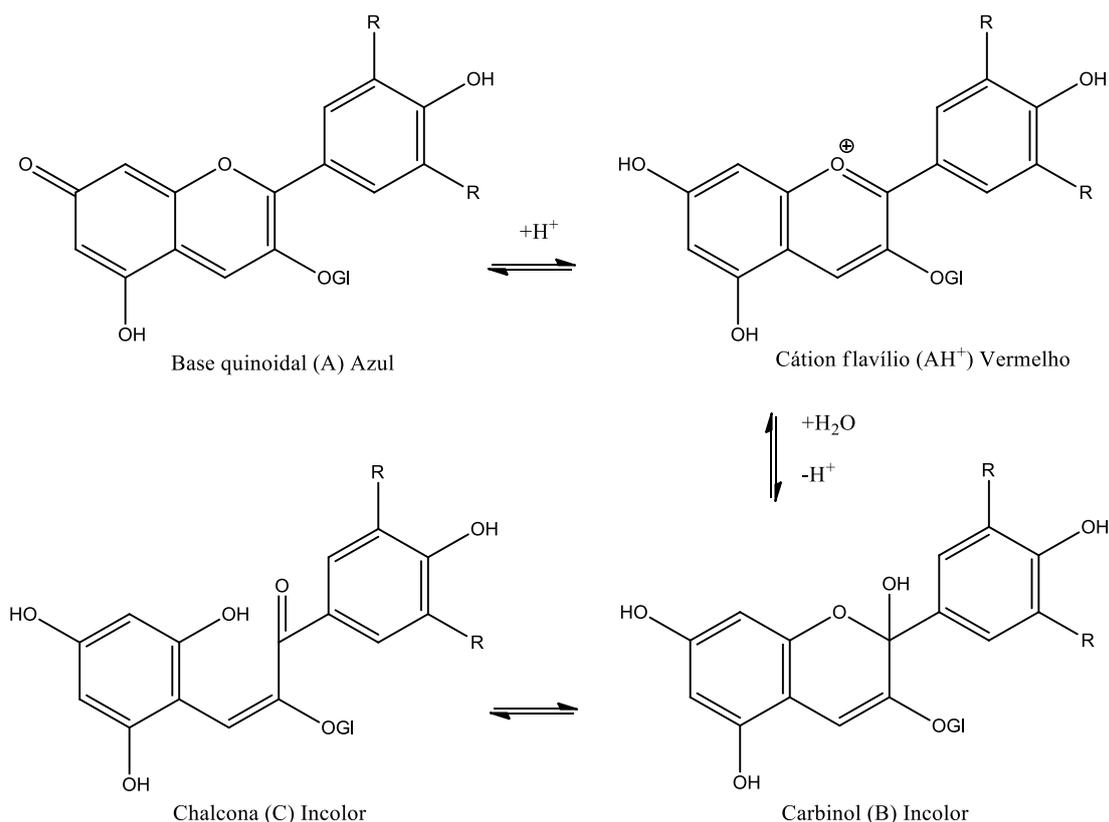


Figura 9: Estruturas moleculares em diferentes valores de pH. (AH⁺) cátion flavílio, (A) base quinoidal; (B) carbinol ou pseudobase; e (C) chalcona.
Fonte: Bordignon et al. (2009).

As formas estruturais das antocianinas podem ser modificadas por diversos fatores, como pH, temperatura, luz, solventes, presença de oxigênio, ligações com outras substâncias, sendo o pH o fator mais influente para a coloração (SAITO et al., 1995; BORDIGNON et al., 2009; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Em meio ácido ($\text{pH} \leq 2$), o cátion flavílio de cor vermelha é a espécie predominante. As antocianinas não acetiladas são apenas estáveis em valores de pH onde o cátion flavílio domina. Em pHs entre 2 e 4 é observada a presença de uma espécie incolor, o hemiacetal, que é convertido em cis e trans-chalconas. Contudo esta conversão é muito lenta à temperatura ambiente e o aumento da temperatura pode deslocar o equilíbrio na direção da formação da base chalcona. Com aumento para pH igual a 6 são formadas as bases quinoidais não carregadas com estruturas roxas e aniônicas com um tom azulado (TIMBERLAKE, 1980; BAŁKOWSKA-BARCZAK, 2005; LOPES et al., 2007; SADILOVA et al., 2007; HE e GIUSTI, 2011).

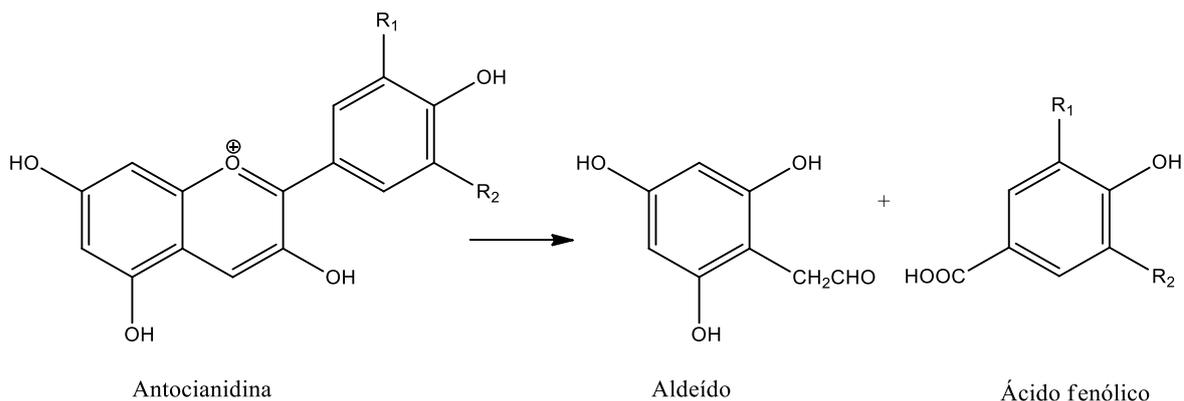
Quanto à termodegradação, à medida que uma solução de antocianinas é submetida à temperatura superior à do ambiente (25°C), sua degradação é maior. Um possível mecanismo de degradação é a abertura do anel do cátion flavílio e sua

conversão na forma chalcona (incolor). Tal degradação é irreversível e confere a formação de produtos de coloração marrom (LOPES et al., 2007; KATO et al., 2012).

Diferentemente das agliconas, as moléculas de antocianinas, mono e diglicosiladas, são mais estáveis em condições de pH neutro. Isto porque os açúcares impedem a degradação de intermediários instáveis em ácidos fenólicos e aldeídos correspondentes (FLESCHHUT et al., 2006).

As antocianinas aciladas são mais estáveis e mais resistentes à perda da cor do que seus análogos não acilados. Esta estabilidade é atribuída à proteção que os grupos acilados conferem ao anel C do cátion flavílio (também chamado de anel pirílio), o que reduz a susceptibilidade ao ataque nucleofílico da água e subsequente formação de uma pseudobase ou uma chalcona (copigmentação intramolecular). Quando diaciladas, as antocianinas podem ser estabilizadas por um empilhamento de tipo sanduíche causado por interações hidrofóbicas entre os resíduos aromáticos planos dos grupos acilados e anel C carregado positivamente, assim, diminuem a formação da pseudobase, apresentando um aumento na estabilidade ainda maior do que as antocianinas monoaciladas (SAITO et al., 1995; GIUSTI e WROLSTAD, 2003; BAŃKOWSKA-BARCZAK, 2005).

Fleschhut e colaboradores (2006) mostraram os produtos da degradação de quatro antocianidinas e seus respectivos ácidos fenólicos, como apresentado na Figura 10. Segundo os autores, a estabilidade das antocianidinas é influenciada pelos substituintes do anel B, em que os grupamentos hidroxila e metoxila diminuem a estabilidade da aglicona em meios neutros.



| Antocianidina | Ácido fenólico correspondente |
|----------------------|--------------------------------------|
| Cianidina | Ácido protocatecuico |
| Malvidina | Ácido siríngico |
| Peonidina | Ácido vanílico |
| Pelargonidina | Ácido p-cumárico |

Figura 10: Degradação de antocianidinas e formação de ácidos fenólicos.
 Fonte: Fleischhut et al. (2006).

3.3.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica altamente difundida, tendo notoriedade devido a sua capacidade de separar componentes químicos de uma mistura e também por poder identificar e quantificar substâncias, quando são utilizados padrões analíticos para comparação e/ou quando utilizada uma técnica analítica confirmatória, como é o caso da espectrometria de massas, em que estas técnicas podem estar acopladas (SKOOG et al., 2006; LANÇAS, 2009).

Esta ferramenta analítica tem aplicação em diversas áreas, como em toxicologia, ciências ambientais, química farmacológica, bioquímica, ciências forenses e ciências dos alimentos (SKOOG et al., 2006).

Em amostras de uva, vinho e suco, esta técnica tem se destacado, principalmente por ser um processo rápido e eficiente para separar e até mesmo isolar pigmentos antocianínicos, outras classes de flavonoides e ácidos fenólicos (LOPES et al., 2007).

A CLAE é um tipo de cromatografia que emprega uma fase estacionária (FE) muito finamente dividida e uma fase móvel líquida (FM), eluída sob altas pressões. Ela é reconhecida por sua alta resolução, eficiência e detectabilidade. Algumas de suas

vantagens são a utilização de pequena quantidade de amostra e o curto tempo de análise (pode levar poucas horas ou apenas alguns minutos) (COLLINS et al. 2006; SKOOG et al., 2006).

O sistema cromatográfico é composto pelos seguintes componentes: o sistema de reservatório de solvente (fase móvel), a bomba, o injetor de amostra, a coluna, o detector e o sistema de aquisição e processamento de dados, conforme ilustrado na Figura 11 (WATERS, 2017).

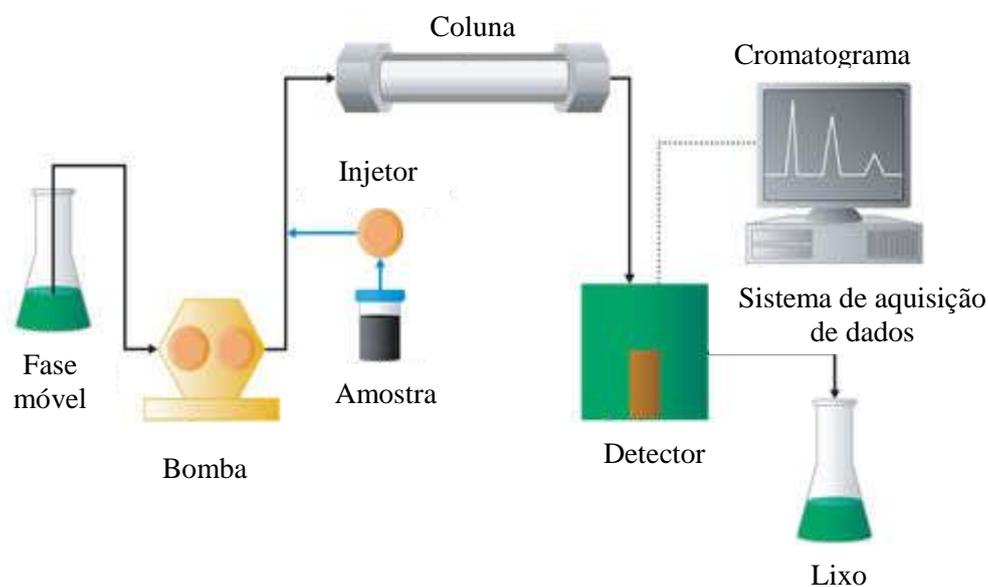


Figura 11: Esquema ilustrativo de um sistema cromatográfico líquido.
Fonte: Waters (2017).

A coluna é considerada um componente fundamental na análise cromatográfica, já que ela é encarregada pela separação dos componentes químicos, a principal função da técnica de cromatografia. Estas são comumente construídas de tubos de aço inoxidável, com recheios geralmente de sílica e partículas tipicamente apresentando diâmetros entre 3 e 10 μm . Entre os tipos de cromatografia utilizados, destacam-se a cromatografia em fase normal e em fase reversa. No primeiro tipo, a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, enquanto, em fase reversa, a fase móvel é mais polar. Atualmente, a cromatografia em fase reversa é amplamente empregada por utilizarem fases móveis aquosas, sendo a coluna do tipo C_{18} (octadecilsílica) a mais usada (DEGANI et al., 1998; SKOOG et al., 2006).

A separação na coluna ocorre primeiramente com a eluição das substâncias com maior afinidade pela FM, ficando mais retidos os compostos que interagem mais com a

FE. As amostras eluídas da coluna são direcionadas para o detector, que gera um sinal proporcional à concentração do analito e é enviado para um sistema de aquisição de dados, que esquematiza as informações como um cromatograma (COLLINS et al., 2006; LANÇAS, 2009).

O sistema de detecção mais adequado deve ser escolhido de acordo com a natureza da amostra. Os mais utilizados na CLAE são os de absorção da radiação ultravioleta ou visível (UV-Vis), como o detector de arranjo de fotodiodos, que possibilita a detecção em vários comprimentos de onda simultaneamente. Neste caso, as substâncias a serem analisadas devem ser capazes de absorver a energia proveniente de comprimentos de onda da região do ultravioleta ou visível no espectro da luz. Esta absorção é afetada pelo número de duplas ligações conjugadas e também pelos grupos funcionais. Isto ocorre porque a absorção nas regiões UV-Vis está relacionada com a transição eletrônica (mudança de estado fundamental para o estado excitado de um elétron), em que elétrons π no sistema conjugado estão mais propensos à transição do que elétrons σ que formam as ligações covalentes simples (COLLINS et al., 2006; SKOOG et al., 2006; SUGIOKA, 2009).

Os espectros de UV-Vis de substâncias, como flavonoides e outros fenólicos, são alterados pelas variações em suas estruturas químicas, facilitando a diferenciação entre os analitos das amostras. Um inconveniente deste método de detecção é a falta de informação estrutural, que possibilita a interferência da matriz das amostras (presença de compostos quimicamente semelhantes) e à identificação errada de picos (YILMAZ e TOLEDO, 2004; FONTANA et al., 2013).

3.3.5. Atividade Antioxidante

Ultimamente, o envolvimento dos radicais livres com diversas doenças crônicas não transmissíveis tem sido foco não só em estudos científicos, como também nas discussões da sociedade, que cada vez mais procura consumir produtos saudáveis. Em vista disso, o consumo de substâncias antioxidantes é fundamental, já que são considerados a principal forma de defesa contra o efeito prejudicial à saúde causado pelos radicais livres (VACCARI et al., 2009).

O processo de respiração e várias outras reações que ocorrem no corpo humano causam a formação de radicais livres. Os radicais livres podem causar danos oxidativos aos lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, o que acarreta uma série de doenças, incluindo

câncer, doenças cardíacas, vasculares, neurodegenerativas, inflamações e até mesmo a aceleração do processo de envelhecimento (EHLENFELDT e PRIOR, 2001; SIKORA et al., 2008).

A maioria dos efeitos biológicos atribuídos aos produtos de origem vegetal estão relacionados à atividade antioxidante. Os antioxidantes naturais, presentes nas plantas, podem atuar como agentes redutores, sequestradores de radicais livres, inibidores de enzimas e como quelantes de metais. Estes mecanismos de ação dos antioxidantes têm importante papel na redução da oxidação lipídica em tecidos vegetal e animal, que podem conferir a redução de risco de desenvolvimento de patologias, como arteriosclerose e câncer e, quando inseridos em alimentos, conservam sua qualidade por um período de tempo mais prolongado (ANGELO e JORGE, 2007; VEDANA et al., 2008).

Diversos métodos químicos, biológicos e eletroquímicos têm sido propostos para avaliar a capacidade antioxidante de compostos como os fenólicos, que tem habilidade de doar hidrogênios ou elétrons, além de apresentar radicais intermediários estáveis, impedindo a oxidação de uma série de ingredientes alimentícios, como óleos e ácidos graxos. Estudos *in vitro* demonstraram que eles atuam como eliminadores de radicais peroxil na formação de complexos com metais (VEDANA et al., 2008; SOARES et al., 2008; FLAMINI et al., 2013).

Visto que não existe um método padronizado oficial, recomenda-se que cada avaliação de atividade antioxidante seja feita com diferentes condições de oxidação e métodos de medição (pelo menos duas metodologias), de modo a fornecer informações completas sobre a capacidade antioxidante total, considerando-se os prós e os contras de cada ensaio, bem como a aplicabilidade de cada um (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2008).

Os métodos utilizados para determinar a capacidade antioxidante são classificados em dois grupos, de acordo com o mecanismo de reação. Há métodos que se baseiam na transferência de átomos de hidrogênio, enquanto os outros métodos são baseados na transferência de elétrons (HUANG et al., 2005 *apud* ZULUETA et al., 2009).

Os ensaios baseados em transferência de elétrons medem a capacidade de um antioxidante reduzir uma espécie oxidante, que muda de cor quando reduzido. O grau de mudança de cor está correlacionado com as concentrações de antioxidantes da amostra. Para este tipo de mecanismo, um dos métodos mais comumente utilizados na medição da atividade antioxidante é pela captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolona-6-

ácido sulfônico) (ABTS), que pode ser gerado por reação química, eletroquímica ou enzimática (Figura 12). Esta metodologia espectrofotométrica permite a avaliação da atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica, medindo a descoloração, decréscimo na absorvância da solução (lida à 734 nm). Isto ocorre porque à medida em que há a adição de antioxidantes ao cátion radical pré-formado, ocorre a redução do $ABTS^{•+}$ e, desta forma, parte do $ABTS^{•+}$ é restaurado em ABTS não radicalar (RE et al., 1999; KUSKOSKI et al., 2005 *apud* RUFINO et al., 2007; RUFINO et al., 2007; ZULUETA et al., 2009).

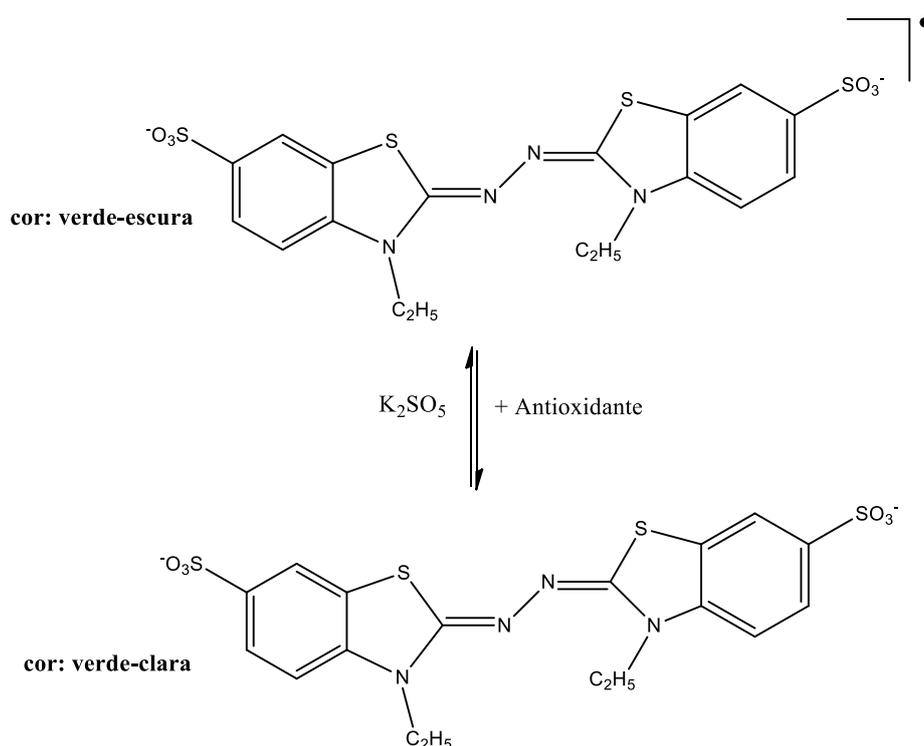


Figura 12: Estabilização do radical $ABTS^{•+}$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.

Fonte: Rufino et al. (2007).

Já nas técnicas baseadas em transferência de hidrogênio, a maioria emprega um esquema competitivo, no qual o antioxidante e o substrato competem por radicais peroxil gerados através da decomposição térmica de compostos azo. Em outras palavras, o antioxidante realiza transferência de hidrogênio para o radical AAPH (Dicloridrato de 2,2,azobis ou 2-metilpropionamida) em excesso, impedindo o ataque do radical à fluoresceína por determinado tempo. Em vista disso, conforme os compostos antioxidante são consumidos, a fluoresceína é oxidada, deixando de emitir fluorescência (ZULUETA et al., 2009; CRUZ, 2013).

Os compostos presentes em matrizes alimentícias de origem vegetal têm diferentes atividades antioxidantes. Volp e colaboradores (2008) descreveram que os compostos fenólicos são efetivos doadores de hidrogênio e que a capacidade antioxidante depende do número e da posição dos grupamentos hidroxilas e sua conjugação. As antocianinas têm conhecida capacidade antioxidante, devido a sua estrutura química, que é capaz de doar elétrons ou átomos de hidrogênio para radicais livres. A presença de hidroxilas nos carbonos 3 e 4 do anel B aumentam estabilidade ao radical formado e as hidroxilas livres em C3 do anel C e C5 do anel A, junto do grupo carbonila em C4 são doadores de elétrons. Contudo, a presença de açúcares na molécula minimiza a atividade oxidante.

3.4. Métodos de extração de compostos bioativos

A recuperação de compostos bioativos pode ser realizada através de diferentes métodos de extração. As técnicas clássicas para a extração a partir de matrizes vegetais são baseadas na escolha do solvente, juntamente com o uso de calor e/ou agitação. Um dos procedimentos de extração mais utilizados é a agitação mecânica, além de outros como por Soxhlet, hidrodestilação e maceração.

Para a extração de compostos fenólicos presentes em uva, solventes como metanol, etanol, acetona e água têm sido os mais utilizados, sendo o metanol de maior capacidade de extração de fenólicos. Para a extração de pigmentos, o solvente orgânico é combinado geralmente com ácido clorídrico, uma vez que o pH da solução de extração também afeta a recuperação de fenólicos. Contudo, o HCl é corrosivo, e deve ser substituído por ácidos mais fracos, principalmente na área de alimentos, podendo-se optar pela utilização de ácido cítrico, entre outros (WANG e WELLER, 2006; LOPES et al., 2007; FONTANA et al., 2013; DROSOU et al., 2015).

Além do solvente, outros fatores exercem influência na extração, como temperatura, razão sólido-líquido, tamanho de partícula, tempo de extração, dentre outros (BUCIĆ-KOJIĆ et al., 2009).

É bem conhecido que os compostos fenólicos existem tanto em formas livres como ligadas em células vegetais, e que os compostos fenólicos livres são extraíveis em solventes aquosos e orgânicos ou suas misturas, enquanto que os fenólicos ligados não são facilmente extraídos, sendo necessário adicionar outras etapas de extração, como

por exemplo hidrólise ácida, básica ou tratamento enzimático (PÉREZ-JIMÉNEZ e TORRES, 2011; SU et al., 2014).

A extração convencional compreende técnicas de extração sólido-líquido que dependem geralmente de solventes orgânicos e estes podem apresentar problemas, como toxicidade, transformação química de extratos e potencial poluição ambiental devido a grandes volumes de solvente orgânico utilizado. Ademais, estas técnicas podem possuir outras desvantagens, como a perda de compostos devido à hidrólise e oxidação durante a extração, assim como tempo de extração prolongado, já que muitas vezes a extração convencional é limitada pelas resistências à transferência de massa de ambas as fases (GHAFOR et al., 2009; PINGRET et al., 2013; GONZÁLEZ-CETENO et al., 2014; DROSOU et al., 2015).

Diante dessas desvantagens, buscaram-se métodos mais sustentáveis, em que o consumo de solventes e o tempo de extração sejam minimizados e o rendimento de extração aumentados. Um destes solventes é o etanol, que é um solvente mais barato, biologicamente seguro (de acordo com a definição da US Food and Drug Administration, FDA, 2004), além de ser preferível no caso de utilização posterior em alimentos (NAWAZ et al., 2006; BARBA et al., 2016).

No estudo de Rockenbach et al. (2008) sobre a influência do solvente na extração de fenólicos e antocianinas, demonstrou-se que dentre as misturas etanol/água, a porcentagem que melhor extraiu os compostos fenólicos foi a de 50%, enquanto para antocianinas, de 50% e 70%. Resultados similares foram observados nos trabalhos de Nawaz et al. (2006), de Bucić-Kojić et al. (2009) e de Simić et al. (2016), que conseguiram obter extratos fenólicos com bom rendimento utilizando etanol 50% em água.

Buscando aprimorar o desempenho das extrações convencionais, superando alguns dos problemas encontrados, surgiram tecnologias inovadoras ou não-convencionais, como aplicação de campos elétricos pulsados, extração assistida por ultrassom, assistida por micro-ondas, processamento por alta pressão, extração com fluido supercrítico e acelerada por solvente. Todas estas tecnologias visam evitar/minimizar o uso de solventes orgânicos, reduzir o tempo de tratamento, diminuir a temperatura de processamento, intensificar o processo de transferência de massa, aumentar os rendimentos de extração e/ou reduzir consumo de energia (WANG e WELLER, 2006; FONTANA et al., 2013; BARBA et al., 2016).

3.5. Extração assistida por Ultrassom

A aplicação do ultrassom é uma alternativa conveniente às extrações convencionais, porque pode aumentar a eficiência de extração de compostos em uma única extração, reduzindo consideravelmente o tempo de processo (FONTANA et al., 2013).

O ultrassom é uma onda mecânica que apresenta frequências maiores que 20 kHz, valor superior ao limite da audição humana. Na extração assistida por ultrassom, geralmente são usadas frequências entre 20 e 100 kHz. Este tipo de ultrassom se diferencia do ultrassom diagnóstico, que faz uso de frequências acima de 2 MHz e até 10 MHz, com aplicação na medicina e em processamento de materiais. Estas ondas propagam-se em meios sólidos, líquidos e gasosos. Um dos fenômenos gerados pela propagação do ultrassom em meios líquidos é a cavitação (WANG e WELLER, 2006; CRAVOTTO e CINTAS, 2006; CHEMAT et al., 2017).

As forças de cavitação resultantes da aplicação de ultrassom ocorrem pela implosão de microbolhas que são formadas devido a oscilações de pressão (compressões e rarefações alternadas) causadas pela passagem das ondas acústicas no meio líquido. Essas microbolhas formadas crescem até atingirem tamanho instável e colapsarem, como ilustrado na Figura 13 (CRAVOTTO e CINTAS, 2006; GONZÁLEZ-CENTENO et al., 2014; BARBA et al., 2016).

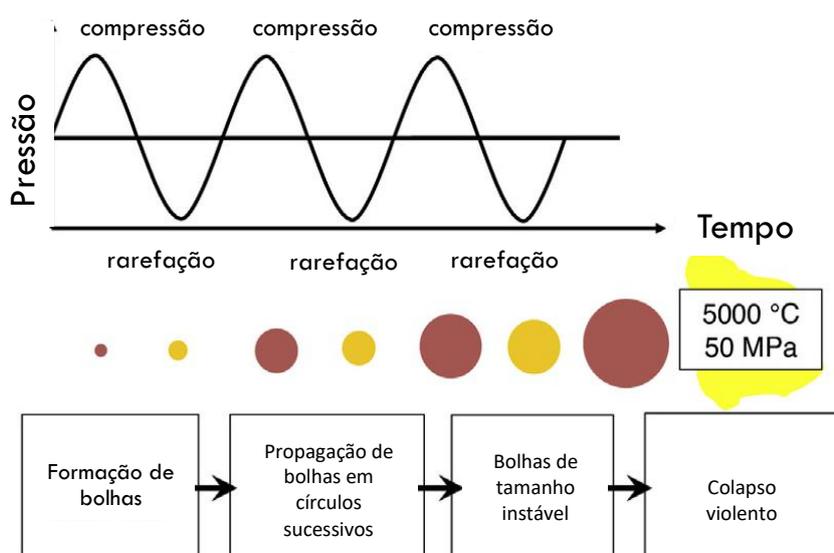


Figura 13: Fenômeno de cavitação.
Fonte: Barba et al. (2006).

A implosão/colapso gera rápida compressão adiabática dos gases e vapores dentro das bolhas ou cavidades e, como consequência, altas temperaturas e pressões são produzidas. Isso gera a ruptura das paredes celulares das plantas, facilitando o acesso ao conteúdo celular, o aumento da solubilidade do analito, a penetração de solvente na matriz de amostra e a maior superfície de contato entre a fase sólida e líquida, devido a maior transferência de calor e massa, obtendo como resultado uma melhor extração (GHAFOOR et al., 2009; CASAZZA et al., 2010; GONZÁLEZ-CENTENO et al., 2015; BARBA et al., 2016).

Em comparação com métodos convencionais, o ultrassom apresenta várias vantagens, como menor tempo de processo, maior penetração e baixo consumo do solvente, maior rendimento, boa reprodutibilidade, possibilidade de utilização de solventes alternativos mais econômicos e mais seguros para o ambiente e para a saúde. Com todas estas vantagens, a aplicação do ultrassom em escala industrial pode representar ganhos econômicos valiosos. Assim, esta tecnologia pode ser facilmente implementada para melhorar a eficiência de extração de compostos fenólicos, tais como flavonoides, flavonóis, além de açúcares, minerais e carotenoides (VILKHU et al., 2008; PINGRET et al., 2013; BARBA et al., 2016).

Por se tratar de uma onda mecânica, suas características, como frequência, comprimento de onda e amplitude, podem influenciar a cavitação acústica e, portanto, a extração dos compostos de interesse, acarretando no interesse em otimizar todas essas variáveis de processo para a melhor utilização de energia, tempo, matéria-prima e/ou solvente (GONZÁLEZ-CENTENO et al., 2015; CHEMAT et al., 2017).

Os equipamentos de ultrassom mais utilizados são o banho de ultrassom e a sonda ultrassônica. O banho ultrassônico é o tipo mais comum, e geralmente consiste em um tanque de aço inoxidável com um ou mais transdutores, que funcionam a uma frequência de cerca de 40 kHz e que podem ser equipados com controle de temperatura. Estes são equipamentos mais baratos, facilmente disponíveis e podem tratar um grande número de amostras simultaneamente. No entanto, em comparação com o ultrassom com sonda, apresentam baixa reprodutibilidade, trabalham com baixas potências e aplicam sonicação de forma indireta, havendo perda de energia. As sondas ultrassônicas trabalham com frequências variadas e usam o transdutor ligado à sonda que é imerso no reator, resultando no emprego direto do ultrassom no meio de extração, havendo perda mínima de energia. Além disso, trabalham com altas potências e fornecem alta intensidade de energia em uma área pequena, o que pode trazer aumento na temperatura

do sistema e, conseqüentemente, maiores rendimentos de extração (PINGRET et al., 2013; VINATORU, 2015; CHEMAT et al., 2017).

3.6. Microencapsulação por *spray drying*

A microencapsulação é uma alternativa de proteção aos compostos que se degradam facilmente devido a condições adversas como altas temperaturas, presença de luz, oxigênio, entre outros. O intuito deste processo é aprisionar uma substância (material do núcleo ou agente ativo) dentro de outro material (revestimento, escudo ou material de suporte/parede), formando pequenas partículas, seladas, que podem liberar seu conteúdo a taxas controladas em condições específicas. Esta técnica visa prolongar a vida útil do produto, protegendo os componentes ativos contra a degradação durante o armazenamento e/ou processamento e mantendo a funcionalidade, além de mascarar *flavours*, odores ou sabores indesejados (DESAI e PARK, 2005; CELLI et al., 2015).

A microencapsulação por *spray drying* é o método mais comumente utilizado na indústria de alimentos. Esta técnica baseia-se na secagem por atomização, que é um processo contínuo, simples e rápido no qual um líquido é transformado em um produto em pó após um período de secagem relativamente curto, resultando em partículas geralmente bastante estáveis ao armazenamento. O processo envolve a atomização do líquido em um compartimento que recebe um fluxo de ar quente, de modo que a evaporação rápida da água mantém baixa a temperatura das partículas. Portanto, esta técnica permite a secagem de produtos sensíveis ao calor (produtos alimentares, biológicos e farmacêuticos), sem afetar drasticamente a sua qualidade (RÉ, 1998; DAVIDOV-PARDO et al., 2013).

A Figura 14 ilustra o processo da secagem por atomização no *spray dryer*.

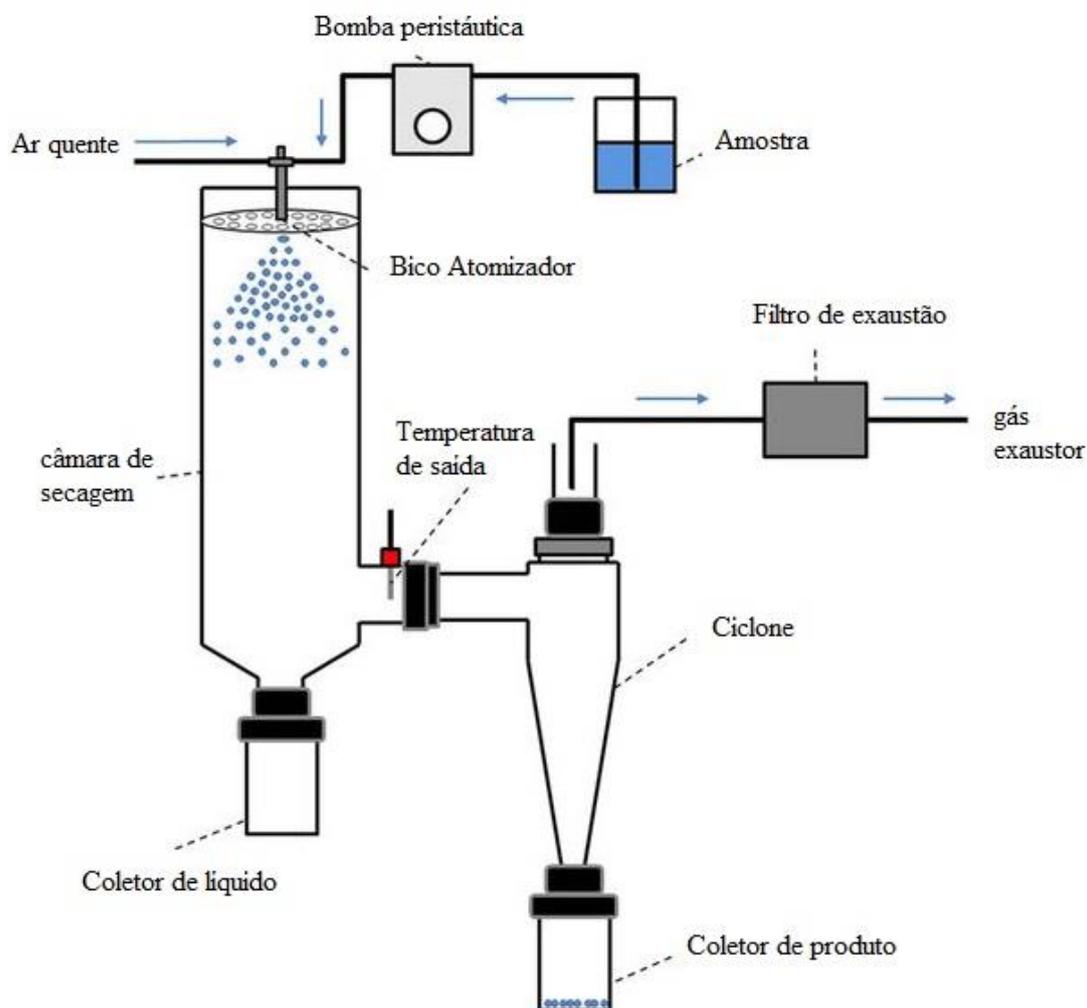


Figura 14: Esquema do *spray dryer*.
 Fonte: Adaptado de Peng et al. (2017).

Os agentes encapsulantes mais utilizados na indústria alimentar são os carboidratos (como maltodextrina, goma arábica, amido modificado ou quitosana), lecitina e certas proteínas tais como derivados de gelatina e proteínas lácteas (MORENO et al., 2016).

A maltodextrina é o material mais utilizado devido a sua solubilidade em água e baixa viscosidade mesmo em soluções concentradas. Sua estrutura é composta por múltiplas unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo α (1 \rightarrow 4). Estas são classificadas por seu equivalente de dextrose (DE – dextrose equivalente), uma medida do grau de hidrólise do polímero de glicose às suas unidades monoméricas constituintes e, portanto, estão disponíveis em diferentes pesos moleculares. A maltodextrina tem por característica sabor suave ou apenas moderadamente doce, apresentando boa relação entre custo e eficácia, apesar da sua capacidade de emulsão

limitada e ter baixa retenção de compostos voláteis (SILVA et al., 2014; ANANDHARAMAKRISHNAN e ISHWARYA, 2015; MORENO et al., 2016).

As proteínas também têm sido utilizadas na microencapsulação de materiais, como: mel (SHI et al., 2013), molho de soja (WANG et al., 2013), extrato de fruta *Garcinia* (EZHILARASI et al., 2014), suco de uva (MOSER et al., 2017a), extrato de bagaço de uva (MORENO et al., 2016), entre outros.

A escolha de proteínas como agentes encapsulantes pode ser devido aos diferentes grupos químicos presentes, suas propriedades anfifílicas, bem como sua capacidade de auto-associar e interagir com vários tipos de substâncias, seu alto peso molecular e flexibilidade da cadeia molecular. As proteínas possuem excelentes propriedades como viscosidade, emulsificação e capacidade de formação de filme, além de apresentar boa recuperação do pó (GALLO et al., 1998; ANANDHARAMAKRISHNAN e ISHWARYA, 2015; MOSER et al., 2017a).

Sabe-se que algumas proteínas podem formar complexos com compostos fenólicos, podendo acarretar em mudanças nas propriedades estruturais, funcionais e nutricionais de ambos os compostos. Estas interações podem ser reversíveis e irreversíveis dependendo do pH, da temperatura e do tipo e concentração de proteínas e fenólicos. Contudo, o mecanismo de como as proteínas influenciam os fenólicos ainda não é completamente conhecido. Além disso, há relatos de que as proteínas diminuem significativamente a capacidade antioxidante em geral, mas há alguns resultados controversos que podem estar relacionados às diferenças nas técnicas analíticas realizadas nesses estudos (ARTS et al., 2002; OZDAL et al., 2013). Dessa forma, o uso de proteínas como agentes encapsulantes na microencapsulação de compostos fenólicos pode representar uma alternativa visando à maior preservação destas substâncias.

A combinação de proteínas e carboidratos já mostrou ter excelentes propriedades para microencapsulação, favorecendo a proteção de compostos bioativos e apresentando boas propriedades de secagem (NESTERENKO et al., 2013 citado por MOSER et al., 2017a; EZHILARASI et al., 2014).

Davidov-Pardo et al. (2013) testaram maltodextrina, zeína e goma mesquita, bem como suas misturas, como agentes encapsulantes para microencapsular, por *spray drying*, polifenóis de extrato de semente de uva. Eles observaram que as duas combinações de agentes encapsulantes mais convenientes para encapsular foram 44% goma mesquita-56% zeína e 34% maltodextrina-66% zeína.

Rajabi et al. (2015) estudaram a microencapsulação de extrato de açafão, também por *spray drying*, com misturas de maltodextrina, goma arábica e gelatina como agentes encapsulantes. Os autores observaram que a estabilidade dos compostos bioativos de açafão aumentou à medida que a quantidade de gelatina diminuiu em sua mistura com maltodextrina e goma arábica, escolhendo como melhor relação m/m de 0,94: 0,05: 0,01 da mistura.

Em 2016, Moreno e colaboradores utilizaram maltodextrina, isolado de proteína de soro de leite e isolado de proteína de ervilha para formular um extrato de bagaço de uva enriquecido com polifenol por *spray drying*. Eles notaram que ambas as proteínas apresentaram desempenho satisfatório, particularmente em proporções muito baixas (razão agente encapsulante/extrato 0,1:1), superando a maltodextrina, maximizando o teor de fenólicos totais e antocianinas, bem como a atividade antioxidante por ORAC.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O procedimento prático foi realizado nas Plantas Piloto de Operações Unitárias e no Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

4.1. Material

Foram utilizados resíduos da uva Syrah, provenientes do processo de produção de espumantes, que são os produzidos em maior volume na região do Semiárido. O resíduo foi fornecido pela Vinícola Ouro Verde, do grupo Miolo, localizada no Vale do São Francisco, município de Casa Nova na Bahia.

4.2. Preparo da amostra

O bagaço foi seco a 45°C em secador de bandejas, durante 24 horas, e em seguida, separado em casca e semente, em uma despoldadeira Bonina 0,25 df (Itabuna, Bahia). A casca foi então moída em moinho de martelo Mill 3000, sendo reduzida a uma “farinha” com diâmetro de partícula médio de $270,8 \pm 26,4 \mu\text{m}$.

A casca moída foi caracterizada em relação ao perfil de ácidos fenólicos, flavonoides não antociânicos, antocianinas, quanto ao teor de antocianinas monoméricas por pH diferencial, de compostos fenólicos por Folin-Ciocalteu e atividade antioxidante por ABTS e ORAC.

4.3. Extração dos compostos fenólicos

A extração dos compostos fenólicos do bagaço de uva foi realizada utilizando-se uma sonda ultrassônica UIP1000hdT (Hielscher, Alemanha) com frequência de 20 kHz, fixando-se o tempo de extração em 3 minutos, em sistema batelada de 40 mL. Como solvente, utilizou-se solução hidroetanólica 50% (v/v) (NAWAZ et al., 2006, BUCIĆ-KOJIĆ et al., 2009; SIMIĆ et al., 2016). A temperatura inicial de operação foi de 26 ± 2 °C. Após o tratamento, os extratos obtidos foram filtrados sob vácuo em papel de filtro qualitativo para as determinações analíticas Quanty® (J.PROLAB, Paraná, Brasil).

O efeito das condições de processo foi analisado de acordo com um delineamento composto central rotacional 2^3 com triplicata no ponto central. Os fatores

avaliados foram a potência de ultrassom (1000 a 3000 W/L), a razão sólido:líquido (1:5 a 1:15) e a porcentagem de ácido cítrico adicionado à solução (0 a 3%), conforme a Tabela 2, totalizando 17 ensaios (Tabela 3). As respostas avaliadas foram o teor de compostos fenólicos totais, de antocianinas totais e a atividade antioxidante pelos métodos ABTS e ORAC.

Tabela 2: Condições do delineamento composto central rotacional

| Níveis | Potência (W/L) | % Ácido | Razão S:L |
|---------------|-----------------------|----------------|------------------|
| -1,68 | 1000 | 0 | 1:5 |
| -1,0 | 1400 | 0,6 | 1:7 |
| 0 | 2000 | 1,5 | 1:10 |
| +1,0 | 2600 | 2,4 | 1:13 |
| +1,68 | 3000 | 3,0 | 1:15 |

Tabela 3: Condições de extração dos 17 ensaios do planejamento experimental

| Ensaio | Potência (W/L) | % Ácido | Razão S:L |
|---------------|-----------------------|----------------|------------------|
| 1 | 1400 | 0,6 | 1:7 |
| 2 | 2600 | 0,6 | 1:7 |
| 3 | 1400 | 2,4 | 1:7 |
| 4 | 2600 | 2,4 | 1:7 |
| 5 | 1400 | 0,6 | 1:13 |
| 6 | 2600 | 0,6 | 1:13 |
| 7 | 1400 | 2,4 | 1:13 |
| 8 | 2600 | 2,4 | 1:13 |
| 9 | 1000 | 1,5 | 1:10 |
| 10 | 3000 | 1,5 | 1:10 |
| 11 | 2000 | 0 | 1:10 |
| 12 | 2000 | 3,0 | 1:10 |
| 13 | 2000 | 1,5 | 1:5 |
| 14 | 2000 | 1,5 | 1:15 |
| 15 | 2000 | 1,5 | 1:10 |
| 16 | 2000 | 1,5 | 1:10 |
| 17 | 2000 | 1,5 | 1:10 |

4.4. Microencapsulação dos extratos por *spray drying*

Como agentes encapsulantes no processo de microencapsulação foram utilizados: maltodextrina 5 DE Globe[®] 1805 (Corn Products, São Paulo, Brasil), gelatina sem sabor Royal[®] (Kraft Foods Global Brands, Paraná, Brasil), isolado proteico de soro de leite Alibra[®] (Alibra Ingredientes, São Paulo, Brasil) e goma arábica Instantgum BA[®] (Colloides Naturels, São Paulo, Brasil).

Os processos de secagem por *spray drying* foram realizados em escala laboratorial utilizando-se o *spray-dryer* da marca Büchi, modelo B190 (Flawil, Suíça).

A temperatura de entrada foi controlada em 165 ± 2 °C e a temperatura de saída foi de aproximadamente 90 ± 2 °C.

O extrato foi microencapsulado por *spray drying* utilizando quatro tipos de agente encapsulante no processo de microencapsulação: maltodextrina, maltodextrina com gelatina (1:1), maltodextrina com goma arábica (1:1) e maltodextrina com isolado proteico de soro de leite (1:1), com 20% de agente encapsulante.

A retenção de antocianinas totais e monoméricas e compostos fenólicos totais foi estimada a partir dos dados em base seca de acordo com a equação a seguir (1), considerando uniformidade do material encapsulado.

$$\text{Retenção (\%)} = \frac{\text{Concentração das substâncias no pó}}{\text{Concentração das substâncias na fração de alimentação}} \times 100 \quad (1)$$

4.5. Métodos analíticos

4.5.1. Análise de antocianinas monoméricas por pH diferencial

A determinação do teor de antocianinas monoméricas das amostras foi realizada pela metodologia de pH diferencial conforme Giusti e Wrolstad (2001), com modificações para as amostras de difícil solubilização.

Cada amostra foi pesada e avolumada com tampões de pH 1,0 (solução de cloreto de potássio acidificada com HCl) e de pH 4,5 (solução de acetato de sódio acidificada com HCl). Foi feita homogeneização em vórtex por 10 s. Os balões ficaram em repouso por 25 min, e as amostras contendo partículas em suspensão foram filtradas em papel de filtro quantitativo Quanty[®] (J.PROLAB, Paraná, Brasil). As amostras de difícil solubilização nos tampões foram aquecidas em banho maria, a 50°C, por cerca de 10 minutos. Decorridos 30 minutos da adição do tampão, realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Micronal, modelo AJX 3002 PC, São Paulo, São Paulo) nos comprimentos 520 nm e 700 nm.

O teor de antocianinas monoméricas foi calculado de acordo com a Equação (2):

$$\text{Abs} = (\text{Abs}_{520} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH } 1,0} - (\text{Abs}_{520} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH } 4,5} \quad (2)$$

$$C \text{ expresso em malvidina 3 glicosídeo (mg/L)} = (\text{Abs} \times \text{PM} \times \text{FD} \times 1000) / \epsilon$$

Onde:

PM = Peso molecular da malvidina-3-glicosídeo = 493,4 g/mol

FD = fator de diluição

ε = Absortividade molar da malvidina-3-glicosídeo = 28000 M⁻¹cm⁻¹.

Os cálculos foram feitos considerando-se a malvidina-3-glicosídeo como a antocianina principal da amostra.

Esta análise foi realizada para os extratos obtidos nas diferentes condições de extração do planejamento experimental, para o extrato obtido com a condição de extração escolhida de acordo com respostas avaliadas (melhor condição) e para os extratos microencapsulados com os diferentes agentes encapsulantes.

4.5.2. Análise de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu

A análise de fenólicos totais foi realizada pelo método espectrofotométrico proposto por Singleton e Rossi (1965) e modificado por Georgé et al. (2005). Os compostos fenólicos foram quantificados por uma curva analítica de ácido gálico de diferentes concentrações (0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg/L) e o teor de fenólicos totais foi expresso em mg de ácido gálico equivalente (AGE) / 100g de amostra.

As amostras líquidas foram diluídas com o solvente utilizado na extração, a fim de obter os valores de absorvância aproximados aos observados na curva analítica; já as amostras em pó foram extraídas com acetona 7% por 30 min, sob agitação magnética. As amostras de difícil solubilização foram colocadas em banho maria, a 50 °C, por 5 min.

Foram pipetados 500 µL do extrato a ser analisado em um tubo de ensaio. Adicionou-se ao tubo 2,5 mL de solução de Follin-Ciocalteu 10%, deixando à temperatura ambiente por 2 min. Posteriormente, foram adicionados 2,0 mL de solução de carbonato de sódio 7,5%. Agitou-se em vortex e levou-se ao banho-maria a 50° C por 15 min. Os tubos foram retirados e colocados em banho de gelo por 30 segundos. Foi realizada então a absorvância da solução.

As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu® UV-1800, Kyoto, Japão) em cubetas de vidro com 1 cm de caminho óptico a 760 nm.

Assim como a análise de antocianinas, esta análise foi realizada para os extratos obtidos nas diferentes condições de extração do planejamento experimental, para o

extrato obtido com a condição de extração escolhida de acordo com respostas avaliadas (melhor condição) e para os extratos microencapsulados com os diferentes agentes encapsulantes.

4.5.3. Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS

A capacidade de sequestro dos radicais $ABTS^{•+}$ das diferentes amostras foi determinada pela metodologia de Re et al (1999).

Assim como para a análise de fenólicos totais, as amostras líquidas foram diluídas no solvente em que foram extraídas, enquanto que as amostras em pó foram diluídas diretamente em solução de acetona 7% em água.

O preparo do radical $ABTS^{•+}$ foi realizado adicionando-se 5 mL da solução 7mM de ABTS em água destilada e 88 μ L de solução de persulfato de potássio (K_2SO_5) 140mM em um frasco âmbar, que permaneceu fechado, ao abrigo de luz e à temperatura ambiente por no mínimo 14 horas, para formação e estabilização do radical $ABTS^{•+}$. Esta solução concentrada de $ABTS^{•+}$ foi diluída em etanol 95% até alcançar absorvância de $0,700 \pm 0,020$ à 734nm.

A curva analítica de Trolox foi construída com soluções nas concentrações de 100, 500, 1000, 1500 e 2000 μ M em etanol 95%, na proporção de 1:100, por 6 min, ao abrigo de luz e à temperatura ambiente, com absorvância lida a 734 nm. Em cada ensaio foi feito um branco, com etanol 95% na mesma proporção.

A atividade antioxidante dos extratos analíticos foi quantificada da mesma forma, ou seja, 30 μ L do extrato analítico e 3,0 mL da solução etanólica de $ABTS^{•+}$ foram homogeneizadas em vórtex, conservadas ao abrigo de luz, à temperatura ambiente e as absorvâncias lidas em espectrofotômetro (Shimadzu® UV-1800, Kyoto, Japão) a 734nm, após 6 minutos da adição da solução do radical. A análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos em μ mol Trolox Equivalente/g.

Análise realizada para os extratos obtidos nas diferentes condições de extração do planejamento experimental, para o extrato obtido com a condição de extração escolhida de acordo com respostas avaliadas (melhor condição) e para os extratos microencapsulados com os diferentes agentes encapsulantes.

4.5.4. Determinação da atividade antioxidante pelo método ORAC

A determinação da atividade antioxidante das diferentes amostras por ORAC (*Oxygen Radical Antioxidant Capacity*) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Zuleta et al. (2009).

Tanto as amostras líquidas quanto as amostras em pó foram diluídas em solução tampão fosfato 75 mM pH 7,4 até que a concentração final estivesse entre 20 e 100 μ M equivalente a Trolox.

Para a confecção da curva analítica de Trolox foram utilizados os pontos 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 μ M, obtidos a partir de uma solução estoque de Trolox 500 μ M e diluídos em solução tampão fosfato 75 mM pH 7,4.

Foram preparados 50 mL de solução de fluoresceína sódica 78 nM e 10 mL de solução 221 mM de radical AAPH (Dicloridrato de 2,2-Azobis (2-metilpropionamida) em solução tampão fosfato 75 mM pH 7,4. Estas soluções foram preparadas no dia da análise.

Em uma microplaca preta (Greiner 96 Flat Bottom Black Polystyrol), com a solução de fluoresceína 78 nM como referência, foi feita a leitura da fluorescência do meio reacional, mostrando a oxidação da fluoresceína.

A análise foi realizada a 37 °C em leitor de microplaca Tecan modelo Infinite 200- TWT (Grödig, Austria) com comprimento de onda de excitação de 485 nm e comprimento de onda de emissão de 535 nm, com leitura de cima para baixo.

Na microplaca preta pipetou-se 80 μ L das soluções de Trolox ou de extrato diluído, e o sistema de injeção do equipamento dispensou 80 μ L da solução de fluoresceína 78 nM nas posições contendo as amostras e 200 μ L nas posições de referência da fluorescência. A placa foi agitada e permaneceu no equipamento a 37 °C e a leitura da fluorescência das posições de referência foi realizada por dez minutos. O branco foi obtido com a solução tampão (80 μ L). Após a leitura da fluorescência inicial, com o segundo sistema de injeção do equipamento foram dispensados 40 μ L da solução de AAPH em todas as posições (exceto nas posições de referência) e a leitura da fluorescência medida imediatamente e a cada minuto, em modo cinético, até que se atingisse uma leitura inferior a 5% da fluorescência inicial.

A área abaixo da curva (AUC – *area under curve*) das soluções padrão de Trolox, das amostras e do branco foi calculada com o auxílio do programa computacional Prisma (GraphPad Software, Califórnia, EUA), através do qual as

leituras de fluorescência ao longo do tempo de reação foram plotadas. As diferenças entre os valores de AUC das diferentes concentrações de Trolox e AUC do branco foram utilizadas para a construção da curva analítica.

Para a quantificação das amostras, foi utilizada a equação abaixo (3), em que são empregados os coeficientes linear e angular, obtidos na curva analítica.

$$ORAC (\mu mol Trolox.g^{-1}) = \frac{[(AUC amostra - AUC branco) - b]}{a \cdot Concentração da amostra} \quad (3)$$

onde,

AUC amostra - área abaixo da curva calculada para a amostra;

AUC branco - área abaixo da curva calculada para branco;

b – coeficiente linear;

a – coeficiente angular;

Concentração da amostra em solução dada em mg.L⁻¹.

Esta análise foi realizada para os extratos obtidos nas diferentes condições de extração do planejamento experimental, para o extrato obtido com a condição de extração escolhida de acordo com respostas avaliadas (melhor condição) e para os extratos microencapsulados com os diferentes agentes encapsulantes.

4.5.5. Análise de ácidos fenólicos e flavonoides não antociânicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD)

A análise dos ácidos fenólicos e flavonoides não antociânicos por CLAE-DAD foi realizada para a caracterização do bagaço de uva e para o extrato obtido com a melhor condição de extração, escolhida de acordo com respostas avaliadas do planejamento experimental.

Para as análises de caracterização do bagaço por CLAE, a amostra foi peneirada em peneira de 150 mesh.

A extração de ácidos fenólicos e flavonoides foi realizada em duas etapas, a partir das modificações propostas por Nascimento (2015), dos métodos descritos a seguir.

Na primeira etapa de extração, com o intuito de extrair os compostos fenólicos livres, utilizou-se a metodologia de Pérez-Jiménez et al. (2008), com modificações. Nesta etapa, se extrai a amostra com solventes polares e apolares, a fim de garantir a detecção de compostos fenólicos com polaridades diferentes. A amostra foi pesada em tubo de centrífuga de 50 mL e foram adicionados 4 mL de metanol:água (50:50 v/v; pH 2). Seguidamente foi agitada em agitador magnético à temperatura ambiente por 1h. Posteriormente, o tubo foi centrifugado a 5000 rpm por 10 min, a 4°C. O sobrenadante (denominado sobrenadante 1) foi recolhido e reservado. Ao precipitado, foram adicionados 4 mL de acetona:água (70:30; v/v) e as etapas de agitação e centrifugação foram repetidas. O sobrenadante 2 foi recolhido e reservado. Ambos os sobrenadantes foram misturados na proporção 1:1 e esta mistura foi filtrada em membrana de 0,22 µm, acoplada a uma seringa e foi transferida para *vial* de 1,5 mL para posterior injeção em cromatógrafo.

Com o resíduo gerado na primeira etapa foi realizada a extração dos fenólicos hidrolisáveis, empregando o método adaptado de Frighetto e Baccan (2012). Foi adicionada uma mistura de 5 mL de solução NaOH 2 M contendo 1% de ácido ascórbico e 10 mM de EDTA, para a hidrólise básica, colocando-se em estufa a 60°C por 60 minutos. Com a solução ainda quente, foi feita acidificação com 1,5 mL de HCl 6 M, agitando-se em vórtex por 10 segundos e então deixando-se resfriar até a temperatura ambiente. Posteriormente, a amostra foi submetida à centrifugação por 10 minutos a 5000 rpm. Extraíu-se o sobrenadante com acetato de etila (2 vezes, com 6,5 mL), primeiramente no vórtex por 30 segundos, seguido de 5 minutos no banho de ultrassom. As fases orgânicas foram combinadas e evaporadas até secagem sob nitrogênio. O resíduo foi retomado em 2 mL da mistura metanol:água (80:20), levado ao banho de ultrassom por 5 minutos e filtrado através de membrana de 0,22 µm, acoplada a uma seringa e foi realizada então a análise cromatográfica.

Para o extrato ultrassônico, alíquotas foram secas em ar comprimido e solubilizadas em metanol 80% em água e procedeu-se a análise cromatográfica.

4.5.5.1. Condições cromatográficas para determinação de ácidos fenólicos e flavonoides não antociânicos por CLAE-DAD

A análise cromatográfica foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Waters® Alliance modelo 2690/5 (Milford, USA), com detector de arranjo de

fotodiodos Waters® modelo 2996 (varredura 210 a 600 nm, com quantificação em 270; 310 e 370 nm). O método baseia-se na separação cromatográfica em coluna de fase reversa (C₁₈, Thermo BDS HYPERSIL, 100 mm x 4,6 mm e 2,4 µm) a 40°C, em modo de eluição por gradiente (Tabela 4) de ácido fosfórico 1,5 mL.L⁻¹ em água e acetonitrila, com fluxo de 1,0 à 1,2 mL.min⁻¹, volume de injeção de 5 µL e tempo de corrida de 30 min.

Tabela 4: Gradiente de eluição da fase móvel para separação de ácidos fenólicos e flavonoides.

| Tempo de corrida (minutos) | % Ácido fosfórico 1,5 mL/L em água | % Acetonitrila |
|---------------------------------------|---|-----------------------|
| 0 | 95 | 5 |
| 6 | 95 | 5 |
| 8 | 88 | 12 |
| 12 | 88 | 12 |
| 18 | 80 | 20 |
| 22 | 70 | 30 |
| 23 | 40 | 60 |
| 25 | 40 | 60 |
| 26 | 95 | 5 |
| 30 | 95 | 5 |

4.5.5.2. Quantificação dos ácidos fenólicos e flavonoides não antociânicos

A quantificação dos ácidos fenólicos e flavonoides foi realizada por padronização externa através da construção de curvas analíticas a partir de padrões analíticos comerciais, os quais foram dissolvidos em metanol 80% em água. Na Tabela 5 estão apresentadas as equações da reta e os coeficientes de determinação (R²) das curvas analíticas preparadas para cada substância.

Tabela 5: Equações da reta e coeficientes de determinação das curvas analíticas

| Substância | Equação da reta | R ² |
|----------------------|---|----------------|
| Ácido gálico | $Y=1,28 \times 10^7 x - 5,13 \times 10^4$ | 0,9999 |
| Ácido protocatecuico | $Y=1,85 \times 10^7 x - 5,71 \times 10^4$ | 0,9999 |
| Ácido vanílico | $Y=9,77 \times 10^6 x$ | 0,9950 |
| Ácido siríngico | $Y=1,14 \times 10^7 x$ | 0,9951 |
| Ácido p-cumárico | $Y=3,33 \times 10^7 x$ | 0,9979 |
| Ácido elágico | $Y=7,28 \times 10^6 x - 2,48 \times 10^4$ | 0,9999 |
| Catequina | $Y=2,34 \times 10^6 x$ | 0,9955 |
| Epicatequina | $Y=2,17 \times 10^6 x$ | 0,9977 |
| Rutina | $Y=6,12 \times 10^6 x - 4,39 \times 10^4$ | 0,9999 |
| Miricetina | $Y=1,54 \times 10^7 x$ | 0,9977 |
| Quercetina | $Y=1,67 \times 10^7 x - 6,80 \times 10^4$ | 0,9999 |
| Kaempferol | $Y=1,11 \times 10^7 x$ | 0,9979 |
| Isorhamnetina | $Y=9,76 \times 10^7 x$ | 0,9979 |

4.5.6. Análise de antocianinas monoméricas por CLAE-DAD

A análise de antocianinas foi aplicada na caracterização do bagaço de uva e para o extrato obtido com a condição de extração escolhida de acordo com respostas avaliadas do planejamento experimental.

O método de extração de antocianinas foi realizado de acordo com Santiago et al. (2010). As amostras foram pesadas em tubos com tampa de rosca e extraídas adicionando-se 2 mL de ácido fórmico 10% em metanol, com agitação por 1 min em vórtex, utilizando banho de ultrassom por 10 min. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 6000 rpm por 10 min (20°C) e o sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL. A extração foi repetida até que a coloração do sobrenadante não tivesse alteração característica de antocianinas. Em seguida, avolumou-se o balão para 10,0 mL com ácido fórmico 10% em MeOH e agitou-se o mesmo. Uma alíquota do extrato foi microcentrifugada (14000 rpm por 5 minutos) e evaporada. O extrato seco foi solubilizado com solução de MeOH 10% em ácido fórmico 5% (solução de injeção), transferido para *vial* e a amostra foi injetada no cromatógrafo.

Já para a análise cromatográfica do extrato ultrassônico, alíquotas do extrato líquido foram concentradas por cartucho (Sep-Pak C₁₈ Waters®), em que as antocianinas ficam retidas no cartucho e são retiradas com o auxílio de solução de ácido fórmico 10% em MeOH, esta solução contendo as antocianinas foi seca e, em seguida, foi realizada solubilização em MeOH 10% em ácido fórmico 5% para a injeção da amostra no cromatógrafo. Procedeu-se então análise cromatográfica.

4.5.6.1. Condições cromatográficas para determinação de antocianinas monoméricas por CLAE-DAD

A análise cromatográfica foi feita de acordo com a metodologia descrita por Gouvêa et al. (2015), com modificações, em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Waters® Alliance modelo 2690/5 (Milford, USA), detector de arranjo de fotodiodos Waters® modelo 2996 (varredura 210 a 600 nm, com quantificação em 520 nm) e os compostos identificados por comparação do tempo de retenção, dos espectros de UV e espectros de massa acurada dos padrões. O método baseia-se na separação cromatográfica em coluna de fase reversa (coluna C18, Thermo BDS Hypersil, 100 mm x 4,6mm e 2,4µm) a 40°C em modo de eluição por gradiente (Tabela 6), com fase móvel ácido fórmico 5% em água e acetonitrila, com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, volume de injeção de 20µL e tempo de corrida de 35 min.

Tabela 6: Gradiente de eluição da fase móvel para separação de antocianinas

| Tempo de corrida (minutos) | Ácido fórmico 5% em água | Acetonitrila |
|---------------------------------------|-------------------------------------|---------------------|
| 0 | 95 | 5 |
| 2 | 93 | 7 |
| 10 | 90 | 10 |
| 15 | 87 | 13 |
| 16 | 85 | 15 |
| 20 | 83 | 17 |
| 30 | 80 | 20 |
| 33 | 95 | 5 |
| 35 | 95 | 5 |

4.5.6.2. Cálculo da concentração de cada antocianina na amostra

Todas as antocianinas foram calculadas utilizando a curva analítica da malvidina, já que esta foi a antocianina majoritária nas amostras. A equação da reta da curva analítica da malvidina foi: $Y=5,36 \times 10^7 x - 5,08 \times 10^3$, $R^2=0,9993$.

A concentração de cada antocianina presente na amostra foi calculada pela equação (4):

$$mg. 100g^{-1} \text{ ou } mg. 100mL^{-1} = \frac{(\text{área de cada pico} - b) \times FD}{a \times \text{massa ou volume da amostra}} \quad (4)$$

Onde: b = Coeficiente Linear (intercessão)

a = Coeficiente angular (inclinação)

FD = Fator de diluição

4.5.6.3. Isolamento e identificação das antocianinas de interesse

O isolamento das substâncias de interesse foi feito de acordo com a metodologia descrita por Gouvêa et al. (2012). Para duas antocianinas majoritárias foram realizadas sucessivas coletas de cada pico de interesse, automaticamente, com o auxílio de válvula Rheodyne[®], com seis canais, conectada a saída do detector (DAD). Através do software Empower[®] a válvula foi programada para direcionar a saída do detector para o canal desejado assim que a antocianina de interesse começasse a ser eluída, voltando à programação para o canal referente ao descarte (lixo) ao final da eluição da antocianina.

Cada solução contendo a antocianina isolada foi purificada em cartucho Sep-Pak C₁₈, da marca Waters[®] (Milford, USA), previamente acondicionado com 5,0 mL da solução de ácido fórmico/metanol 10:90, v/v. Após a saturação do cartucho usando extrato de antocianina isolada, este foi lavado com 10,0 mL de solução de água Milli-Q/ácido fórmico 99,9/0,1, v/v. Em seguida foi feita a lavagem do cartucho e as antocianinas foram eluídas com 2 mL de metanol.

Cada antocianina isolada foi identificada por espectrometria de massas, conforme o método de Gouvêa e colaboradores (2014), utilizando o sistema *Synapt* da marca Waters[®] (Milford, USA), com inserção direta da amostra. Este sistema é composto pelos analisadores quadrupolo ortogonal e tempo de voo (Q-TOF, em inglês,

Quadropole Time of Flight) de alta resolução, que fornece a massa exata com precisão até a quarta casa decimal, assim é possível identificar substâncias de maneira mais exata. A fonte de ionização utilizada foi electrospray em modo positivo (ESI) com as seguintes condições: temperatura da fonte de 120°C, gás de dissolvatação (N₂) com fluxo de 5 L.min⁻¹ e temperatura de 500°C, energia de capilar de 3,0 kV, energia do cone de amostragem de 25 V e energia de colisão de 8,0 V.

4.5.7. Análise estatística

A Análise de Variância (ANOVA), o teste de falta de ajuste, a determinação dos coeficientes de regressão e a obtenção das superfícies de resposta foram realizadas com o auxílio do software Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, USA).

As amostras microencapsuladas foram avaliadas pelo teste de comparação de médias através do teste de Tukey e análise de variância ANOVA ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$), utilizando o software Statistica 10.0 (StatSoft, Tulsa, USA).

Os desvios-padrão, coeficientes de variação, equações da reta, foram calculados com auxílio do programa Excel[®] 2010.

4.6. Caracterização dos extratos microencapsulados

4.6.1. Sólidos Totais e Umidade

A análise do teor de sólidos totais e umidade foi realizada pela metodologia A.O.A.C. (2016), utilizando pesa-filtro com areia para o extrato líquido e pesa-filtro sem areia para amostras em pó. Esta técnica se baseia na determinação do peso seco obtido pela secagem em estufa a vácuo a 60 °C do material de interesse até a obtenção de peso constante. Esta análise foi realizada em duplicata. Os valores foram expressos em percentagem de massa.

Os cálculos para determinar o teor de sólidos totais e umidade estão expressos nas equações (5) e (6), respectivamente.

$$\text{Sólidos totais (g/100g)} = \frac{(P1 - P2)}{(P1 - P)} \times 100 \quad (5)$$

$$Umidade (g/100g) = \frac{(P2 - P)}{(P1 - P)} \times 100 \quad (6)$$

Onde, P= peso do pesa-filtro vazio ou com areia secos; P1= peso em g do pesa-filtro com amostra seca ou com areia+ amostra úmida; P2= peso em g do pesa-filtro com resíduos da amostra após evaporação ou com areia + resíduos após evaporação.

4.6.2. Distribuição do tamanho de partículas

A distribuição do tamanho das partículas foi determinada em um aparelho com difração a laser SDC – Microtrac S3500 (Microtrac, Montgomery Ville, USA), utilizando isopropanol como meio de dispersão, uma vez que a solubilização das partículas não ocorre neste líquido. Uma pequena quantidade de amostra foi dispersa em isopropanol e submetida a 3 leituras de distribuição do tamanho de partículas. Foi calculado o *span* da distribuição das partículas, para medir a dispersibilidade. Ele foi definido como $(D90 - D10)/D50$, onde D10, D50 e D90 são os diâmetros em 10, 50 e 90% de volumes cumulativos, respectivamente (ISMAIL et al., 2016).

4.6.3. Morfologia das partículas

O estudo da morfologia das partículas foi realizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram fixadas em *stub*, suporte metálico, com uma fita adesiva de dupla face condutora convencional. As amostras foram então observadas em um microscópio eletrônico de varredura (modelo TM 3000, Tabletop Microscope Hitachi, Tóquio, Japão), com o programa TM 3000, operando com 15 kV.

4.7. Estabilidade dos extratos microencapsulados

Os extratos microencapsulados foram distribuídos em embalagens metalizadas e o extrato líquido foi acondicionado em frasco de vidro âmbar com tampa de rosca, em uma câmara com controle de umidade relativa e temperatura (Câmara climática SL- 206 SOLAB - Piracicaba, Brasil) mantendo-se uma umidade relativa de 50% e temperatura de 40°C, com o intuito de acelerar a degradação dos compostos bioativos.

Os extratos foram avaliados semanalmente, durante um mês, quanto aos teores de antocianinas monoméricas (item 4.5.1), fenólicos totais (item 4.5.2) e capacidade antioxidante pelo método ABTS (item 4.5.3).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extração por ultrassom

Os resultados obtidos nos 17 experimentos do planejamento experimental estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Antocianinas monoméricas (AM), compostos fenólicos totais (FT), atividade antioxidante por ORAC e ABTS dos extratos obtidos nas diferentes condições do planejamento experimental.

| | Potência (W) | % Ácido | Razão S:L | AM (mg.100g ⁻¹)* | FT (mg.100g ⁻¹)* | ORAC (μmol.g ⁻¹)* | ABTS (μmol.g ⁻¹)* |
|----|--------------|---------|-----------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 1 | 1400 | 0,6 | 1:07 | 521±16 | 6.890±131 | 275±4 | 560±110 |
| 2 | 2600 | 0,6 | 1:07 | 587±48 | 7.166±39 | 292±3 | 680±53 |
| 3 | 1400 | 2,4 | 1:07 | 572±1 | 7.281±47 | 317±3 | 694±42 |
| 4 | 2600 | 2,4 | 1:07 | 565±30 | 7.011±62 | 294±17 | 731±75 |
| 5 | 1400 | 0,6 | 1:13 | 559±32 | 6.840±45 | 281±13 | 527±26 |
| 6 | 2600 | 0,6 | 1:13 | 639±42 | 8.216±199 | 396±3 | 661±52 |
| 7 | 1400 | 2,4 | 1:13 | 600±35 | 6.724±60 | 281±7 | 600±26 |
| 8 | 2600 | 2,4 | 1:13 | 685±11 | 11.732±126 | 516±17 | 914±124 |
| 9 | 1000 | 1,5 | 1:10 | 516±13 | 6.498±54 | 295±5 | 642±85 |
| 10 | 3000 | 1,5 | 1:10 | 662±31 | 9.238±101 | 388±33 | 862±66 |
| 11 | 2000 | 0 | 1:10 | 589±6 | 7.321±37 | 299±9 | 442±37 |
| 12 | 2000 | 3 | 1:10 | 679±17 | 9.299±17 | 375±1 | 939±110 |
| 13 | 2000 | 1,5 | 1:05 | 453±6 | 6.485±40 | 230±1 | 724±37 |
| 14 | 2000 | 1,5 | 1:15 | 623±14 | 7.958±79 | 316±10 | 857±64 |
| 15 | 2000 | 1,5 | 1:10 | 593±22 | 8.095±37 | 267±5 | 798±62 |
| 16 | 2000 | 1,5 | 1:10 | 628±8 | 8.476±89 | 324±9 | 912±60 |
| 17 | 2000 | 1,5 | 1:10 | 615±11 | 8.221±114 | 265±5 | 865±47 |

* Média ± desvio padrão, n = 3; Resposta para antocianinas expressa em mg.100g⁻¹ de bagaço, por equivalência a malvidina-3-glicosídeo; para compostos fenólicos totais expressa em mg.100g⁻¹ de bagaço, por ácido gálico equivalente; para análise de atividade antioxidante por ORAC, em μmol. g⁻¹ de bagaço, em trolox equivalente.

Os valores de pH das soluções hidroetanólicas utilizadas para extração por ultrassom foram medidos. A solução contendo 0,6% ácido cítrico teve pH igual a $3,06 \pm 0,01$; a de 1,5% apresentou pH de $2,87 \pm 0,02$; o pH da solução 2,4% foi de $2,76 \pm 0,01$, enquanto a solução contendo 3% de ácido cítrico apresentou pH igual a $2,71 \pm 0,01$.

5.1.1. Antocianinas monoméricas

O teor de antocianinas monoméricas presentes nos extratos obtidos por ultrassom variou de 453 ± 6 a 685 ± 11 mg mv-3-gli.100 g⁻¹ de bagaço.

Valores inferiores foram observados por Boonchu e Utama-Ang (2015) na extração hidroetanólica (50%) convencional de bagaço de *Vitis vinifera* (variedade conhecida como “Black queen”). Os autores obtiveram um extrato com $139 \pm 0,17$ mg.100 g⁻¹ de antocianinas totais.

Rockenbach et al. (2011) avaliaram a extração de antocianinas do bagaço de quatro variedades de uva, dentre as quais três apresentaram menor teores de antocianinas monoméricas, sendo estas a Cabernet Sauvignon, Merlot (ambas *Vitis vinifera* L.) e Isabel (*Vitis labrusca* L.). A variedade na qual se observou valor superior foi a Bordeaux (*Vitis labrusca* L.), com 1.122 mg.100 g⁻¹ de antocianinas monoméricas. Neste trabalho foi realizada extração com homogeneizador tipo Ultra-Turrax por uma hora, usando metanol acidificado (0,1% HCl) como solvente.

Drosou et al. (2015) avaliaram três extratos, um obtido a partir do bagaço de uva sem tratamento, outro do bagaço submetido a secagem solar acelerada e um terceiro do bagaço submetido a secagem convectiva, obtendo teores de antocianinas totais de 3.131,2, 2.412,0 e 3.418,8 mg.100 g⁻¹ de extrato seco.

De acordo com a Análise de Variância (Anexo A), o teste F apresentou resultados satisfatórios, tanto para a regressão (F calculado > F tabelado) como para os resíduos (F calculado < F tabelado), indicando que o modelo pode ser considerado preditivo.

A equação codificada obtida para representar o teor de antocianinas monoméricas (AM), modelo construído a partir dos parâmetros significativos obtidos pela regressão, dentro das faixas estudadas de potência do ultrassom (US), concentração de ácido e razão S:L foi:

$$AM = 567,5 + 31,8 x_1 + 18,1 x_2 + 35,5 x_3 - 23,5 x_3^2 \quad (R^2 = 0,850) \quad (8)$$

Onde x_1 , x_2 e x_3 são a potência do ultrassom, a concentração de ácido e a razão S:L, respectivamente.

A Figura 15 apresenta as superfícies de resposta obtidas pelo planejamento experimental e permitem verificar a influência da potência de US, da porcentagem de ácido e da razão sólido/líquido, sobre o teor de antocianinas monoméricas (AM).

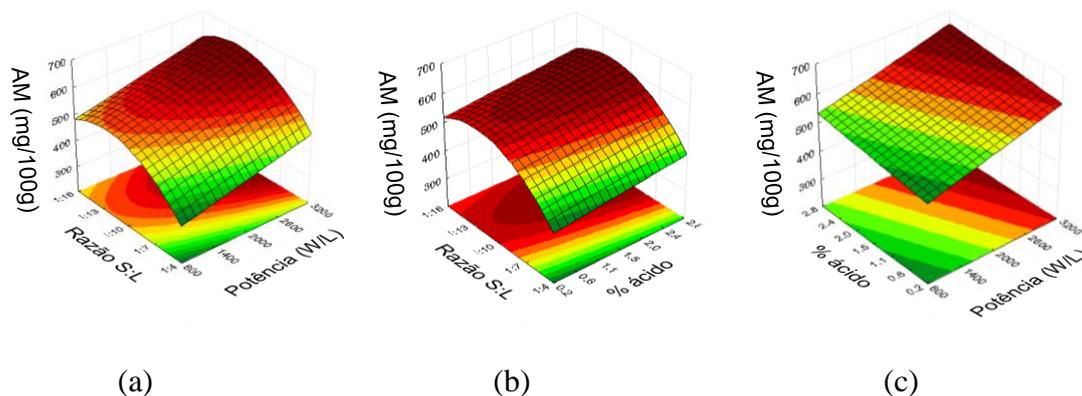


Figura 15: Superfícies de resposta para antocianinas monoméricas nas condições: (a) 1,5% de ácido cítrico; (b) 2000 W/L; (c) S:L = 1:10.

De acordo com a Figura 15, maiores níveis de potência de ultrassom (US) combinados com o aumento da porcentagem de ácido e/ou do volume de solução foram favoráveis para a extração de antocianinas totais assistida por US.

O aumento na potência do ultrassom acarreta em um aumento nos efeitos de cavitação, que em meio líquido ocorre como resultado do ciclo de compressão e rarefação de ondas ultrassônicas. Com a cavitação são formadas microbolhas, e o número de bolhas depende do número de ciclos de compressão e rarefação gerados, que, por sua vez, depende da potência do ultrassom (AL-DHABI et al., 2017). Com a implosão das bolhas há maior difusividade do solvente sobre a matriz do material. Ademais, a energia de ultrassom induz cavitação acústica, o que promove aumento na temperatura e pressão, que, com a fragmentação pela onda de choque, pode aumentar a transferência de massa do analito para o solvente (HATJE et al., 2009). Sendo assim, o uso desta tecnologia pode acarretar em uma melhor extração das substâncias presentes na matriz.

A relação sólido-líquido influencia substancialmente o rendimento dos compostos fenólicos. O princípio da transferência de massa afirma que a taxa de difusão dos compostos da amostra para o solvente é diretamente proporcional ao gradiente de

concentração, que aumenta com o aumento do volume de solução extratora (AL-DHABI et al., 2017). Desta forma, conforme observado na Figura 15, o uso de maiores volumes de líquido levou à obtenção de uma maior extração de antocianinas.

Também foi observado que o teor de antocianinas aumentou linearmente com a concentração de ácido. A utilização de ácido é comum na extração de antocianinas, já que a estabilidade de seu cátion flavílio é maior, principalmente em pH próximo de 2. Portanto, o uso de maior proporção de ácido gera diminuição do pH, o que pode aumentar a estabilidade e melhorar a extração destes compostos (VALDUGA et al., 2008).

5.1.2. Compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais presentes nos extratos obtidos por ultrassom variou de 6.485 ± 40 a 11.732 ± 126 mg ácido gálico equivalente (AGE).100 g⁻¹ de bagaço.

Estes valores foram consideravelmente maiores que os obtidos por González-Centeno et al. (2014), utilizando também o ultrassom para extração de bagaço de uva Syrah proveniente de espumante rosé. No entanto, os autores realizaram uma extração aquosa e utilizaram o bagaço úmido e não triturado (portanto, com menor superfície de contato). Além disso, o equipamento utilizado pelos autores foi ultrassom do tipo banho enquanto no presente trabalho foi utilizado um ultrassom de ponteira.

No estudo de Boonchu e Utama-Ang (2015), o extrato obtido na extração hidroetanólica (50%) do bagaço de uva em leite agitado apresentou um teor de compostos fenólicos totais de 10.179 mg AGE.100 g⁻¹.

De acordo com a Análise de Variância (Anexo A), o teste F apresentou resultados satisfatórios, tanto para a regressão (F calculado > F tabelado) como para os resíduos (F calculado < F tabelado), indicando que o modelo pode ser considerado preditivo.

A equação codificada obtida para representar o teor de fenólicos totais (FT), modelo construído a partir dos parâmetros significativos obtidos pela regressão, dentro das faixas estudadas de potência do ultrassom, concentração de ácido e razão S:L foi:

$$FT = 8158,1 + 795,9x_1 + 500,3x_2 + 566,5x_3 - 336,0x_3^2 + 371,9x_1x_2 + 783,3x_1x_3 + 381,5x_2x_3 \quad (R^2 = 0,906) \quad (9)$$

Onde x_1 , x_2 e x_3 são a potência do ultrassom, a concentração de ácido e a razão S:L.

As superfícies de resposta apresentadas na Figura 16 permitem verificar a influência das variáveis sobre os teores de compostos fenólicos totais.

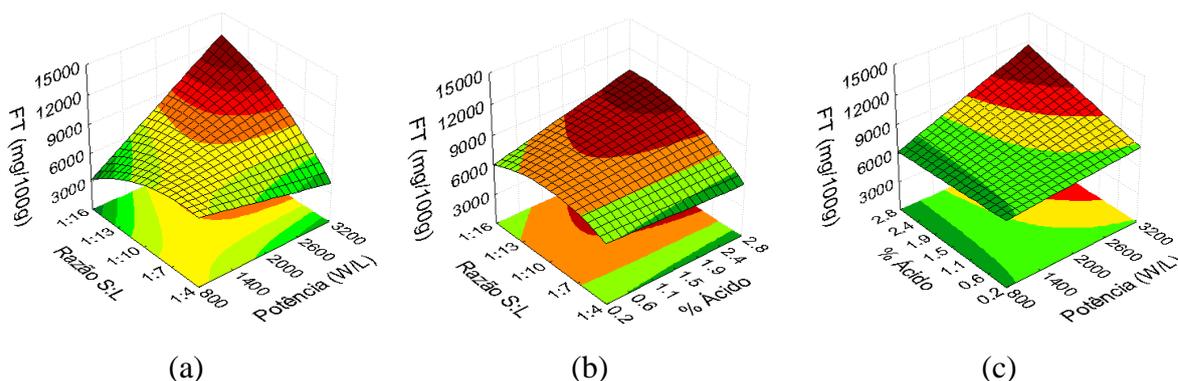


Figura 16: Superfícies de resposta para fenólicos totais, nas condições de: (a) 1,5% de ácido cítrico; (b) 2000 W/L; (c) S:L = 1:10.

De acordo com a Figura 16, o aumento da potência, porcentagem de ácido e volume de solução levou a um aumento no teor de compostos fenólicos, sendo a potência do ultrassom a variável que mais influenciou a resposta avaliada.

Estes resultados estão de acordo com o observado por González-Centeno et al. (2014), que obtiveram maior teor de compostos fenólicos de bagaço de uva com o aumento da potência, na extração aquosa de compostos fenólicos do bagaço de uva, utilizando um banho de ultrassom.

Em relação à razão S:L, quanto maior a quantidade de solução extratora, maior o gradiente de concentração entre o bagaço e a solução, resultando, portanto, em uma extração mais eficiente. Comportamento semelhante foi observado por Bucic-Kojić et al. (2007) na extração hidroetanólica de compostos fenólicos de sementes de uva por extração em leito agitado.

O aumento na concentração de ácido também acarretou em um aumento da extração de fenólicos, embora este efeito tenha sido menos pronunciado, indicando que pHs mais baixos favorecem a extração de compostos fenólicos.

5.1.3. Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante medida pelos métodos ORAC e ABTS nos extratos variou de 230 ± 1 a 516 ± 17 $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$ e de 442 ± 37 a 939 ± 110 $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$, respectivamente.

Em estudo realizado por Rockenbach et al. (2007), quando utilizada solução hidroetanólica (50%) acidificada com HCl a 0,1% como solvente na extração em leito agitado de *Vitis vinifera* das variedades Pinot Noir e Regente, a atividade antioxidante foi, respectivamente, de 471 e 357 $\mu\text{Mol TEAC/g}$ pela técnica de sequestro do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, valores próximos aos menores valores obtidos no presente estudo.

Em 2008, Rockenbach e colaboradores observaram valores inferiores com o método ABTS, na extração em leito agitado das variedades Ancelota e Tannat (ambas *Vitis vinifera*), com solução hidroetanólica (50%) acidificados com HCl a 0,1%, como solvente, obtendo como resposta 400,7 $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$ e 341,5 $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$, respectivamente.

Yilmaz e Toledo (2006), ao utilizarem o método ORAC na extração convencional de bagaços de uva utilizando como solvente metanol/água 70%, observaram para cascas de *Vitis vinifera* das variedades Merlot e Chardonnay, valores de 69,8 e 102,8 $\mu\text{Mol Trolox/g}$ amostra seca, respectivamente, valores inferiores aos obtidos no presente trabalho. Os autores também avaliaram a atividade antioxidante das sementes de Muscadine (*Vitis rotundifolia*), Merlot e Chardonnay, obtendo valores de 245,9; 272,8 e 450,5 $\mu\text{Mol Trolox/g}$ amostra seca, respectivamente.

Os dados obtidos para a atividade antioxidante determinada pelo método ABTS não permitiram a obtenção de um modelo preditivo e, conseqüentemente, de superfícies de resposta. Dessa forma, o efeito das variáveis de processo sobre esta resposta foi expresso através do diagrama de Pareto (Figura 17).

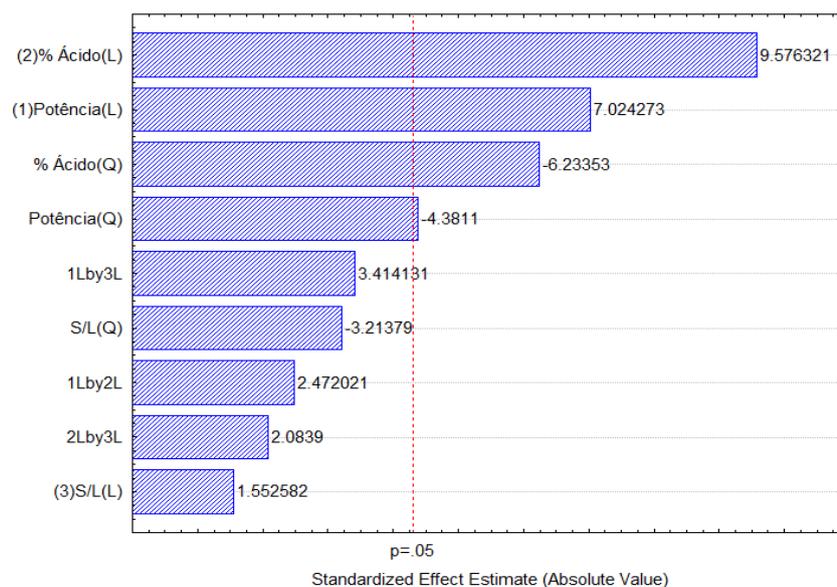


Figura 17: Diagrama de Pareto para avaliar o efeito dos fatores investigados sobre a atividade antioxidante medida pelo método ABTS.

De acordo com a Figura 17, a atividade antioxidante medida pelo método ABTS foi influenciada pela concentração de ácido e pela potência do ultrassom, sendo a primeira a variável que exerceu maior influência. Este resultado pode indicar que a presença do ácido favoreceu a extração de compostos com maior capacidade de sequestro dos radicais ABTS^{•+}, uma vez que a diminuição do pH aumenta a taxa de transferência de elétrons, pois a ionização aumenta a disponibilidade de elétrons (SCHAICH et al., 2015). Além disso, o aumento da potência está diretamente relacionado ao aumento da extração de compostos fenólicos e antocianinas monoméricas, conforme previamente discutido, resultando, assim, em uma maior capacidade antioxidante.

No caso da atividade antioxidante determinada pelo método ORAC, o teste F apresentou resultados satisfatórios, tanto para a regressão ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$) como para os resíduos ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$), indicando que o modelo pode ser considerado preditivo.

A equação codificada obtida para representar a atividade antioxidante por ORAC, modelo construído a partir dos parâmetros significativos obtidos pela regressão, dentro das faixas estudadas de potência do ultrassom, concentração de ácido e razão S:L foi:

$$\text{ORAC} = 266,7 + 36,58x_1 + 21,43x_2 + 32,3x_3 + 4,67 x_3^2 \quad (R^2 = 0,935) \quad (11)$$

Onde x_1 , x_2 e x_3 são a potência do ultrassom, a concentração de ácido e a razão S:L.

As superfícies de resposta apresentadas na Figura 18 permitem verificar a influência das variáveis sobre a atividade antioxidante medida pelo método ORAC.

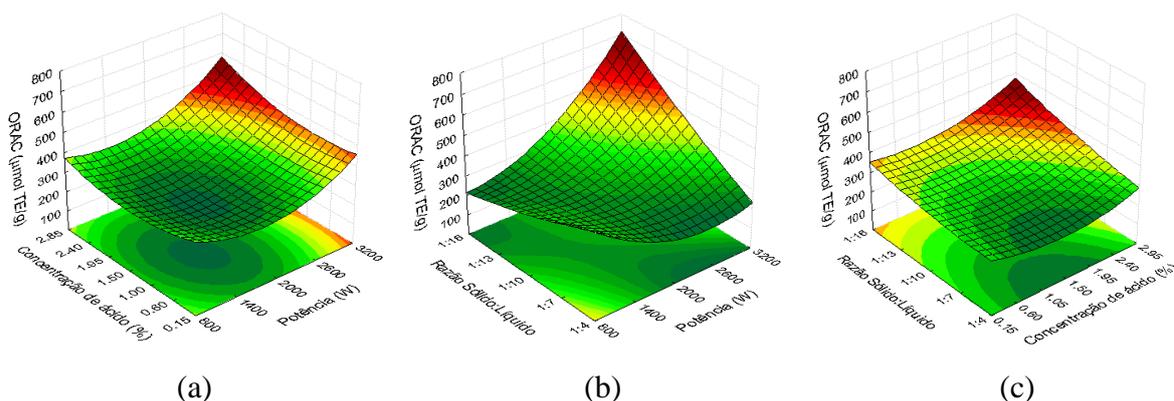


Figura 18: Superfícies de resposta para atividade antioxidante medida pelo método ORAC nas condições: (a) 1,5% de ácido cítrico; (b) 2000 W/L; (c) S:L = 1:10.

Os resultados mostraram que maior atividade antioxidante foi obtida quando utilizadas maiores potências de US, maior concentração de ácido e menor razão sólido:líquido, para ambos os métodos, o que se relacionou com o teor de antocianinas monoméricas e também com os fenólicos totais presentes no extratos, já que estes compostos estão diretamente relacionados ao potencial antioxidante de vários alimentos (ANGELO e JORGE, 2007; BAYDAR et al., 2007; VEDANA et al., 2008).

A atividade antioxidante por ABTS teve a potência e a porcentagem de ácido como os fatores com maior influência, enquanto que por ORAC a potência de ultrassom foi a variável mais influente, o que está relacionado à maior extração de antocianinas observada nessas condições. As antocianinas são oxidadas pelos radicais livres, formando um radical menos reativo e mais estável. Portanto, elas estabilizam as espécies reativas de oxigênio pela sua reação com o componente reativo do radical, pois sua estrutura permite que doem elétrons ou hidrogênios para radicais livres (VOLP et al., 2008).

5.1.4. Seleção da melhor condição de extração

A partir das respostas avaliadas com o planejamento experimental, a condição escolhida como a mais adequada, dentro dos limites avaliados, foi de 3000 W/L de potência, 2,5% de ácido cítrico e razão sólido/líquido de 1:15. O pH do extrato nesta condição foi de $3,23 \pm 0,01$.

Esta condição foi a utilizada para obtenção dos extratos, que foram posteriormente caracterizados por CLAE-DAD e microencapsulados por *spray drying*.

5.2. Caracterização por CLAE-DAD

Embora a análise de fenólicos totais utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu forneça uma ideia geral do teor de compostos fenólicos presentes em uma amostra, esta análise não é seletiva e pode resultar em um valor superestimado, uma vez que mede a capacidade de redução de uma amostra, reagindo não apenas com fenóis, mas também com outros compostos redutores tais como carotenoides, aminoácidos, açúcares e vitamina C (HUANG et al., 2005; OZDAL et al., 2013). Huang et al. (2005) também sugerem que a análise por Folin-Ciocalteu pode ser usada como um indicativo da atividade antioxidante de amostras, pois a dissociação de um próton fenólico leva a um ânion fenolato, que é capaz de reduzir o reagente, ocorrendo então o mecanismo de transferência eletrônica.

Dessa forma, para melhor caracterizar os fenólicos presentes no bagaço e no extrato obtido na melhor condição, foi realizada uma avaliação de seus perfis cromatográficos, para identificação e quantificação dos principais compostos presentes nestes materiais.

5.2.1. Antocianinas monoméricas por CLAE-DAD

Para a análise de antocianinas monoméricas por CLAE-DAD foi inicialmente utilizada a metodologia descrita por Gouvêa et al. (2015). O método utilizado é específico para antocianinas monoméricas, que são as antocianinas que efetivamente possuem atividade biológica comprovada (NASCIMENTO, 2015). Entretanto, como pode ser observado no cromatograma apresentado na Figura 19, este método não foi eficaz na separação de todas as antocianinas da amostra, já que ainda houve a presença

de picos que coeluíram no final da corrida cromatográfica. Sendo assim, a fim de se obter uma separação satisfatória das substâncias, foram realizados diversos testes de modificação de gradiente de eluição.

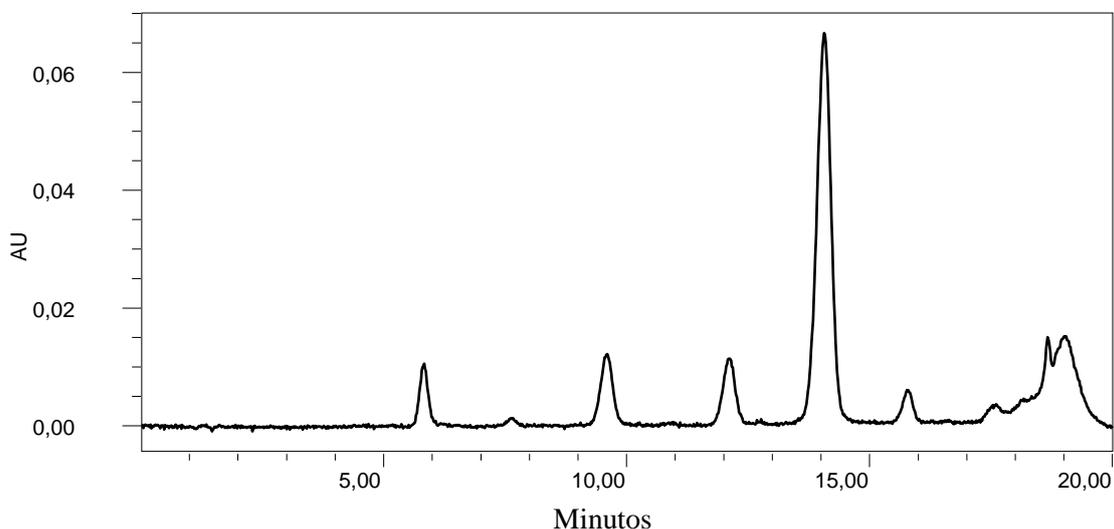


Figura 19: Cromatograma das antocianinas monoméricas do bagaço de uva, pela metodologia de Gouvêa et al. (2015), em 520 nm.

Após determinar a melhor alteração do método, foi obtido o cromatograma apresentado na Figura 20.

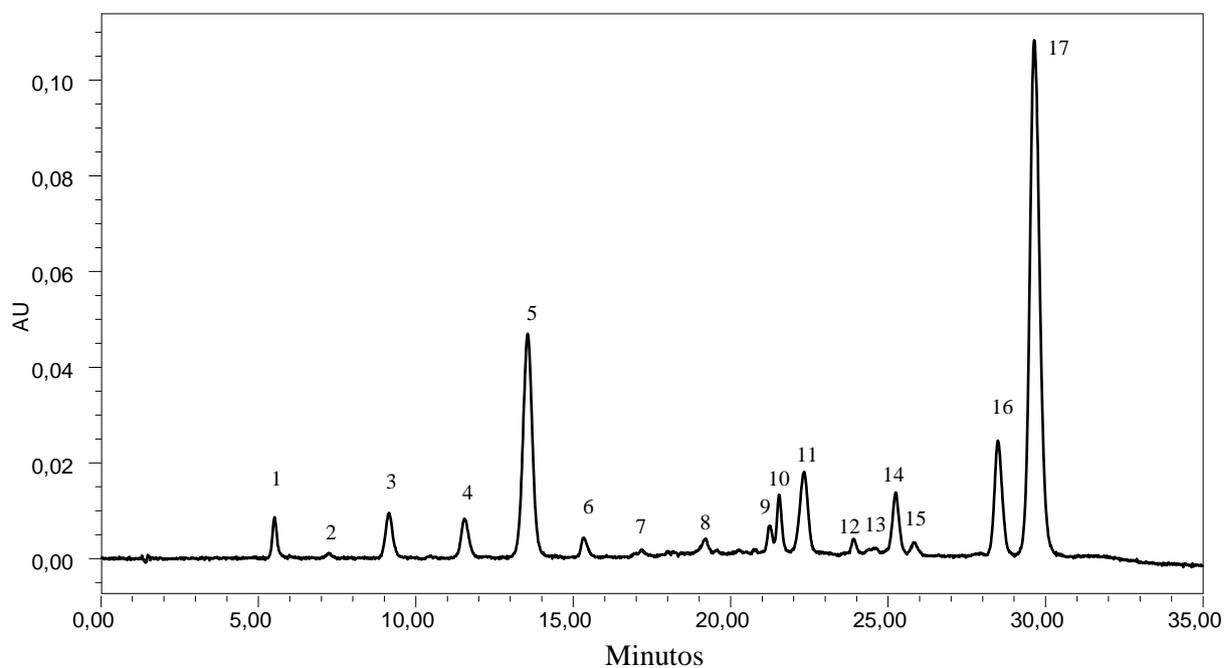


Figura 20: Cromatograma das antocianinas monoméricas do bagaço de uva, em 520 nm.

Com as mudanças no gradiente de eluição houve ganho de resolução e sensibilidade, o cromatograma apresentou picos simétricos, finos e intensos. A partir

deste cromatograma foi possível realizar a identificação das antocianinas, por comparação dos tempos de retenção (t_R) e espectros de UV-Vis dos padrões disponíveis no laboratório, com os picos da amostra. Desta forma foi possível identificar as seguintes antocianinas monoméricas no bagaço de uva: delphinidina-3-glicosídeo ($t_R = 5,8$ min, Pico 1), cianidina-3-glicosídeo ($t_R = 7,6$ min, Pico 2), petunidina-3-glicosídeo ($t_R = 9,6$ min, Pico 3), peonidina-3-glicosídeo ($t_R = 12,1$ min, Pico 4), malvidina-3-glicosídeo ($t_R = 14,1$ min, Pico 5). Os espectros UV-Vis da amostra, estão apresentados na Figura 21.

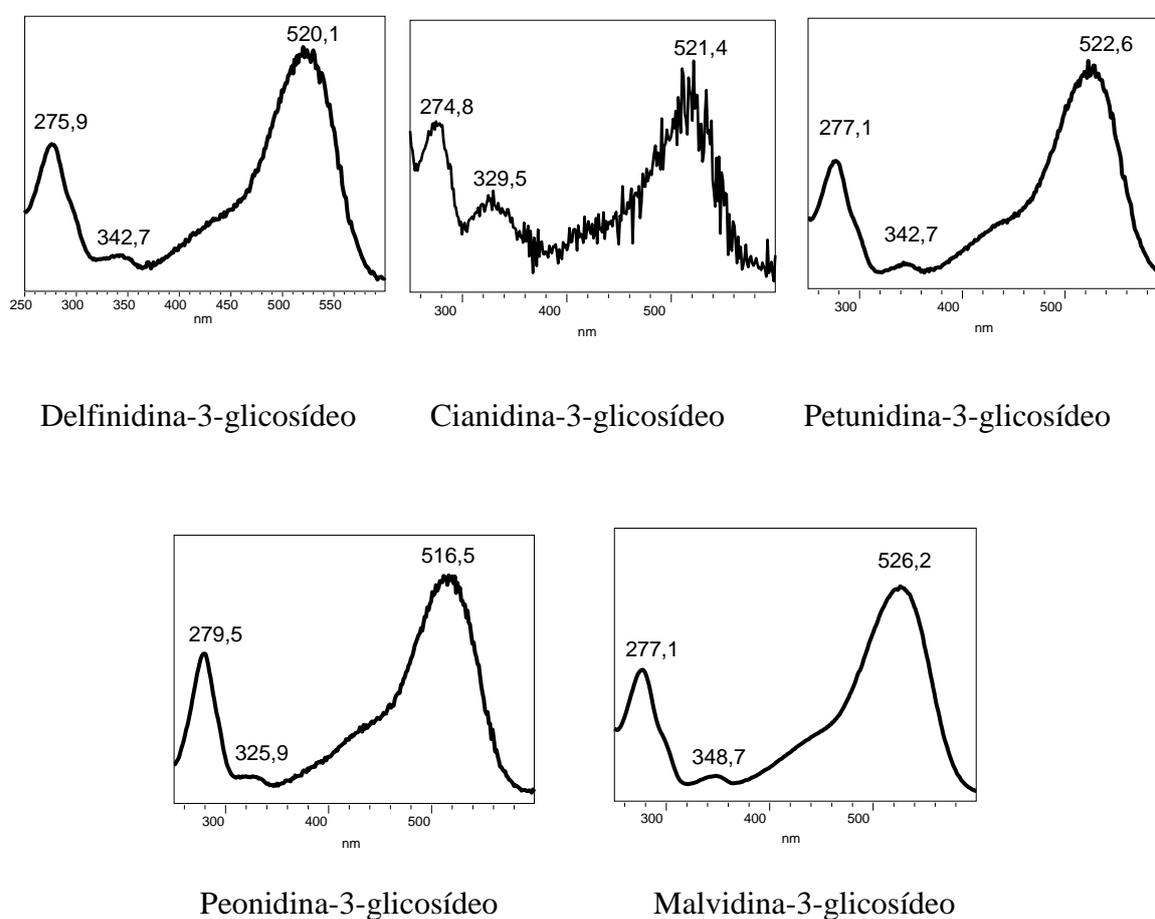


Figura 21: Espectros UV-Vis das antocianinas identificadas, a partir de padrões, nas amostras.

Além das antocianinas identificadas conforme supracitado, também foi realizada a identificação de outras duas antocianinas, referentes aos Picos 16 e 17 do cromatograma. No entanto, não havia padrão para comparação de tempo de retenção e espectro UV-Vis. Dessa forma, para confirmação estrutural, as antocianinas foram isoladas por coleta automática com válvulas Rheodyne[®] ligadas à saída do detector e

submetidas à análise por espectrometria de massas. A Figura 22 apresenta os espectros de massa acurada da antocianina isolada referente ao Pico 16 e a Figura 23 ilustra o espectro UV-Vis da mesma antocianina. O espectro de massa acurada da substância isolada e do espectro de UV-Vis referente ao Pico 17, estão mostrados nas Figuras 24 e 25, respectivamente.

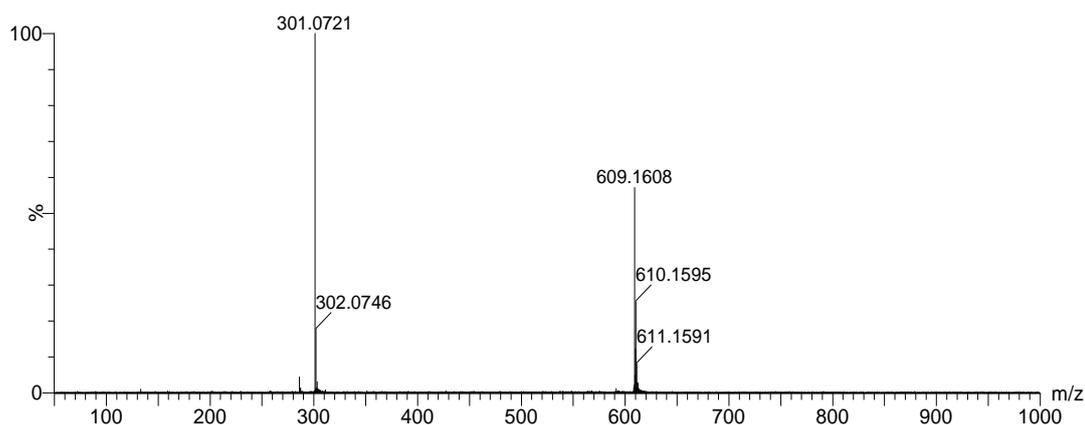


Figura 22: Espectros de massa acurada da antocianina isolada referente ao Pico 16.

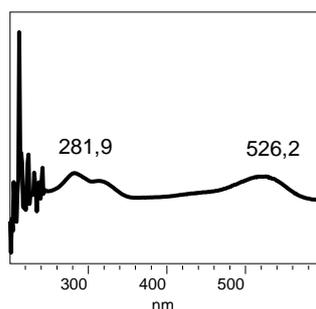


Figura 23: Espectro UV-Vis da antocianina isolada referente ao Pico 16.

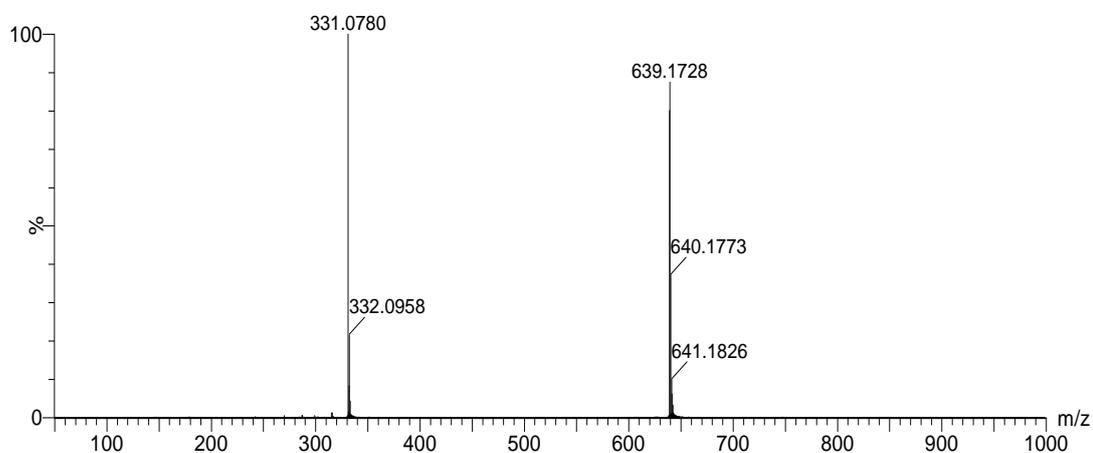


Figura 24: Espectros de massa acurada da antocianina isolada referente ao Pico 17.

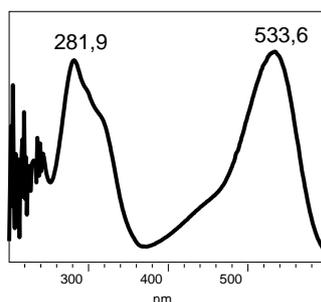


Figura 25: Espectro UV-Vis da antocianina isolada referente ao Pico 17.

A análise por espectrometria de massas do Pico 16 (Figura 22) registrou um íon molecular de m/z 609,1608, e a fragmentação desse íon gerou um íon de m/z 301,0721 que corresponde à massa molar da aglicona peonidina. Esta fragmentação correspondente à perda de um grupo p-cumarilglicose ($M^+ - 308$), e o fragmento obtido condiz com a massa molar da peonidina 3-O-(6-O-p-cumaril) glicosídeo ($t_R = 28,5$ min), uma antocianina acilada.

Para a segunda antocianina isolada, Pico 17, com a análise por espectrometria de massas (Figura 24) verificou-se a presença do íon molecular de m/z 639,1728 e um fragmento de m/z de 331,0780, indicativo de ser a aglicona malvidina. Bem como anteriormente, esta fragmentação correspondente à perda de um grupo p-cumarilglicose ($M^+ - 308$), e o fragmento obtido condiz com a massa molar da malvidina 3-O-(6-O-p-cumaril) glicosídeo ($t_R = 29,6$ min).

No perfil antociânico apresentado na Figura 20, além das sete antocianinas identificadas, que representam 81,2% das substâncias separadas por CLAE, pode ser observada a presença de mais dez antocianinas, representando cerca de 18,8% das antocianinas do perfil. Essa confirmação pôde ser feita devido ao espectro de absorção característica de antocianinas ($\lambda_{max} = 520$ nm). Porém, não foi possível a identificação destas antocianinas, devido à falta de padrão e à dificuldade em coletá-las pela pequena magnitude do pico.

Além da caracterização do bagaço, foi realizada a caracterização do extrato hidroetanólico obtido por ultrassom. Nele também foram detectadas 17 antocianinas, de acordo com os tempos de retenção e os espectros UV-Vis, as mesmas encontradas na caracterização do bagaço. O cromatograma obtido para o extrato está ilustrado na Figura 26.

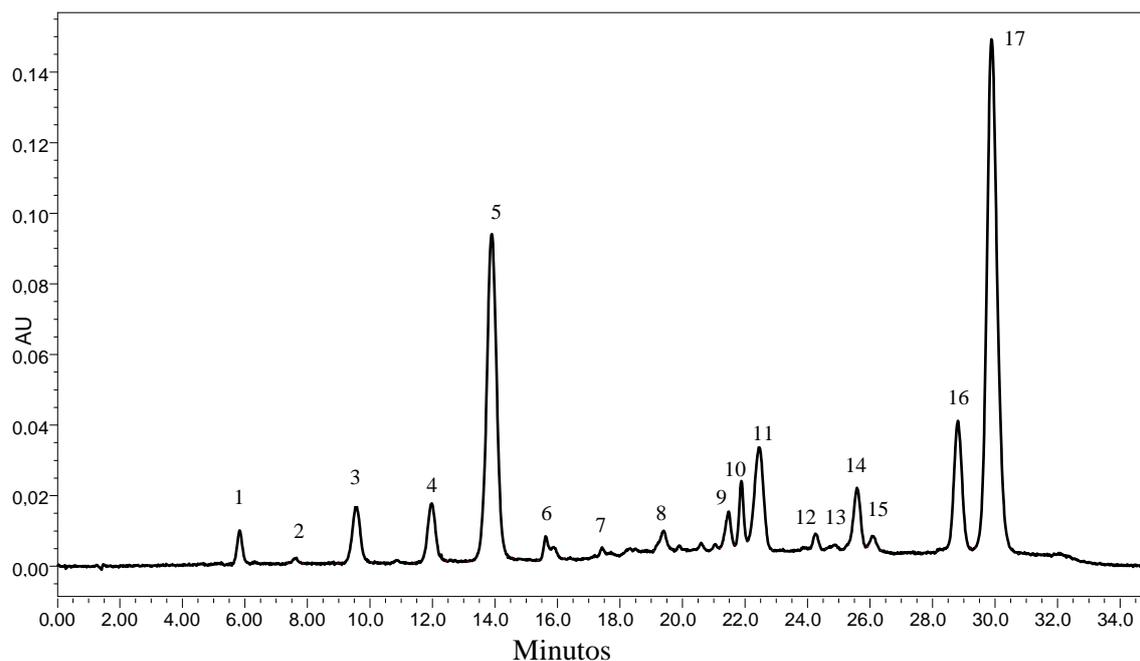


Figura 26: Cromatograma das antocianinas monoméricas do extrato hidroetanólico obtido a partir do bagaço de uva.

Ainda, com o cromatograma obtido na análise das antocianinas presentes no bagaço de uva Syrah e com o cromatograma do extrato obtido por ultrassom, foi realizada a quantificação das antocianinas por equivalência, utilizando curva padrão de malvidina-3-glicosídeo, uma vez que a aglicona majoritária é a malvidina e não havia outros padrões disponíveis. A quantificação das antocianinas presentes no bagaço de uva e no extrato ultrassônico está apresentada na Tabela 8.

Tabela 8: Identificação e quantificação de antocianinas monoméricas presentes no bagaço de uva Syrah e no extrato obtido por ultrassom.

| Analito | Concentração (mg.100g ⁻¹)** | | | |
|--|---|--------------------------------|---|--------------------------------|
| | Antocianinas do bagaço (AB) | Percentual relativo das AB (%) | Antocianinas do extrato ultrassônico (AE) | Percentual relativo das AE (%) |
| Delfinidina-3-glicosídeo | 12,06±0,50 | 1,88 | 4,75±0,28 | 0,87 |
| Cianidina-3-glicosídeo | 3,10±0,26 | 0,48 | 1,52±0,10 | 0,28 |
| Petunidina-3-glicosídeo | 19,84±1,00 | 3,09 | 14,35±1,28 | 2,63 |
| Peonidina-3-glicosídeo | 18,05±0,32 | 2,81 | 17,68±0,82 | 3,24 |
| Malvidina-3-glicosídeo | 122,75±4,77 | 19,13 | 129,77±5,43 | 23,80 |
| Pico 6* | 8,02±0,30 | 1,25 | 4,74±0,14 | 0,87 |
| Pico 7* | 3,64±0,06 | 0,57 | 3,62±0,19 | 0,66 |
| Pico 8* | 6,77±0,20 | 1,06 | 6,00±0,35 | 1,10 |
| Pico 9* | 7,74±0,24 | 1,21 | 8,50±0,27 | 1,56 |
| Pico 10* | 16,52±1,02 | 2,58 | 11,08±0,16 | 2,03 |
| Pico 11* | 39,02±1,68 | 6,08 | 37,04±0,31 | 6,79 |
| Pico 12* | 5,19±0,34 | 0,81 | 3,99±0,19 | 0,73 |
| Pico 13* | 4,03±0,11 | 0,63 | 1,53±0,07 | 0,28 |
| Pico 14* | 24,53±1,08 | 3,82 | 17,94±0,74 | 3,29 |
| Pico 15* | 5,22±0,50 | 0,81 | 3,77±0,35 | 0,69 |
| Peonidina 3-O-(6-O-p-cumaril) glicosídeo | 51,32±2,70 | 8,00 | 45,71±1,47 | 8,38 |
| Malvidina 3-O-(6-O-p-cumaril) glicosídeo | 293,71±17,59 | 45,78 | 233,36±9,41 | 42,79 |
| Total | 641,50 | 100 | 545,34 | 100,00 |

* Picos 6 a 15 não foram identificados. Média ± desvio padrão, n = 3.

O teor total de antocianinas monoméricas presentes no bagaço de uva, quantificadas por CLAE, foi de 641,5 mg.100 g⁻¹. As duas antocianinas majoritárias (malvidina-3-glicosídeo e malvidina 3-O-(6-O-p-cumaril) glicosídeo) equivalem a 64,92 % das antocianinas totais.

Melo e colaboradores (2015) identificaram em bagaço de uva Syrah do semiárido apenas as antocianinas delfinidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo.

Fraige et al. (2014) investigaram as antocianinas presentes em quatro variedades, sendo três de *Vitis vinífera*, inclusive a uva Syrah do seminário brasileiro. Os autores identificaram por CLAE-DAD-EM quatorze antocianinas na uva Syrah, apresentando

um perfil cromatográfico próximo ao obtido no presente trabalho, contudo a antocianina majoritária foi a malvidina-3-glicosídeo, com mais de 32%, enquanto no presente trabalho essa antocianina representou menos de 20% do teor total das antocianinas do bagaço.

Lingua et al. (2016) também caracterizaram o perfil de antocianinas de uvas, bagaços de uvas e vinhos de três variedades vermelhas *Vitis vinifera* L. cultivadas na Argentina, inclusive a espécie Syrah. Avaliando apenas o comportamento da uva Syrah, pode-se notar que a malvidina-3-acetilglicosídeo foi a majoritária na uva. Os autores observaram que entre malvidina-3-glicosídeo e malvidina-3-cumarilglicosídeo, a primeira foi mais encontrada na uva e no vinho, mas não em seu bagaço, que teve a malvidina-3-cumarilglicosídeo como majoritária, assim como observado no presente trabalho.

A presença de acilação na molécula de antocianina melhora a sua estabilidade através de copigmentação intramolecular e/ou intermolecular e reações de auto-associação. Portanto, as fontes de antocianinas aciladas, como é o caso do bagaço da uva Syrah, podem proporcionar cor e estabilidade desejável para aplicações alimentares (GIUSTI e WROLSTAD, 2003).

Com a identificação e a quantificação das antocianinas, pode-se perceber que a extração assistida por ultrassom, utilizando etanol/água (50%) foi capaz de extrair as mesmas antocianinas que a extração para caracterização, que fez uso de ácido fórmico 10% em metanol, e uso de banho de ultrassom. Considerando-se que a extração para caracterização de antocianinas é baseada no esgotamento da sua cor característica, considera-se que esta análise extrai 100% das antocianinas da amostra. Desse modo, foi possível calcular a eficiência da extração ultrassônica, que foi de 85%.

5.2.2. Ácidos fenólicos e flavonoides não antociânicos por CLAE-DAD

Conforme mencionado por Acosta-Estrada et al. (2014), os ácidos fenólicos simples e os flavonoides são os compostos fenólicos mais comuns e, geralmente, são encontrados nas formas conjugadas solúveis (glicosídeos) e insolúveis. Na natureza, os ácidos fenólicos ocorrem principalmente nas formas insolúveis ou ligadas enquanto que os flavonoides se apresentam como glicosídeos, ou seja, com unidades de açúcar ligadas, ou por um grupo OH (O-glicosídeos) ou através de ligações carbono-carbono (C-glicosídeos).

Para a caracterização do bagaço de uva, a fim de se obter uma análise mais completa, a análise de ácidos fenólicos e flavonoides foi realizada em três etapas. Na primeira foram extraídos ácidos fenólicos e flavonoides livres. Posteriormente, foi realizada uma hidrólise básica e uma hidrólise ácida, com o intuito de liberar os ácidos fenólicos e flavonoides para serem identificados e quantificados.

As Figuras 27, 28 e 29 apresentam os cromatogramas da fração de ácidos fenólicos e flavonoides livres e as Figuras 30, 31 e 32 apresentam os cromatogramas da fração de ácidos fenólicos e flavonoides após hidrólises do bagaço de uva, visualizados com absorção nos seguintes comprimentos de onda: 270 nm (Figuras 27 e 30), 310 nm (Figuras 28 e 31) e 370 nm (Figuras 29 e 32) nm.

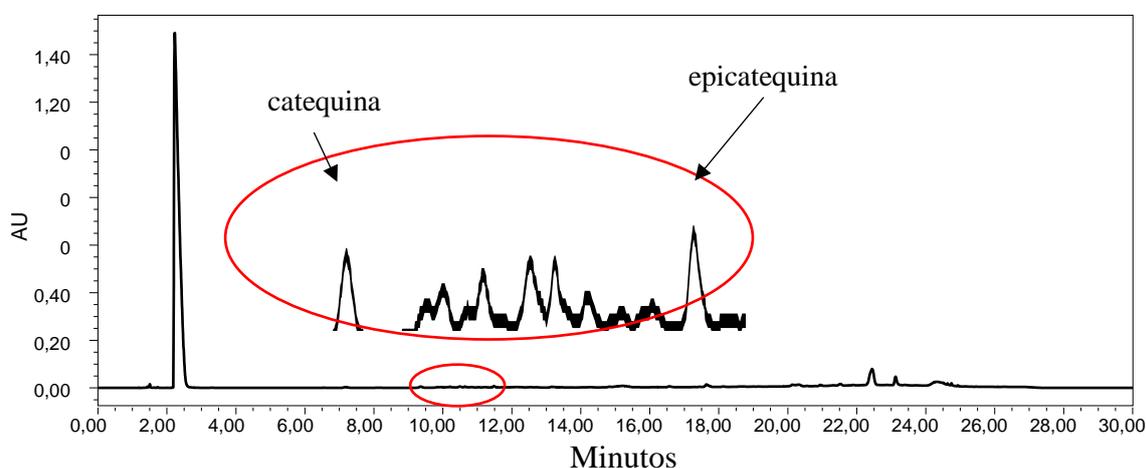


Figura 27: Cromatograma da fração de ácidos fenólicos e flavonoides livres, do bagaço de uva, em 270 nm, com zoom nos picos de interesse.

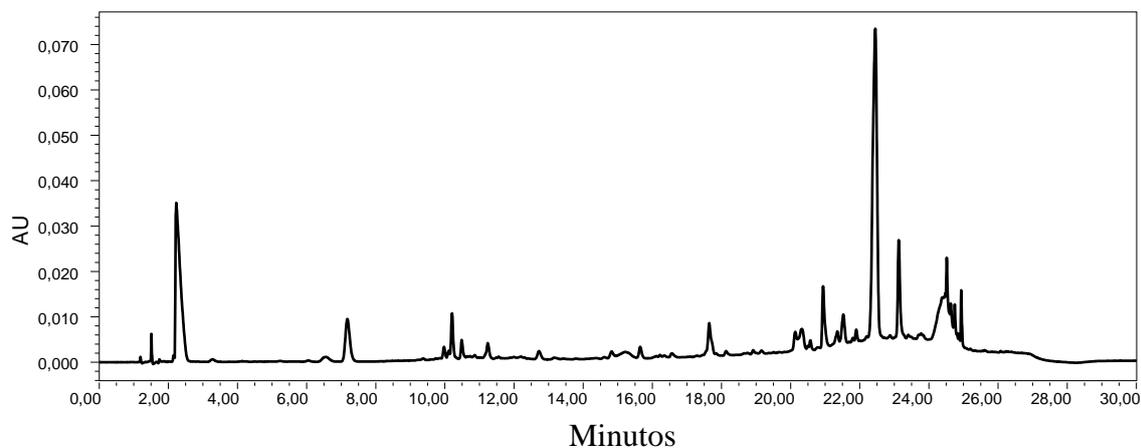


Figura 28: Cromatograma da fração de ácidos fenólicos e flavonoides livres, do bagaço de uva, em 310 nm.

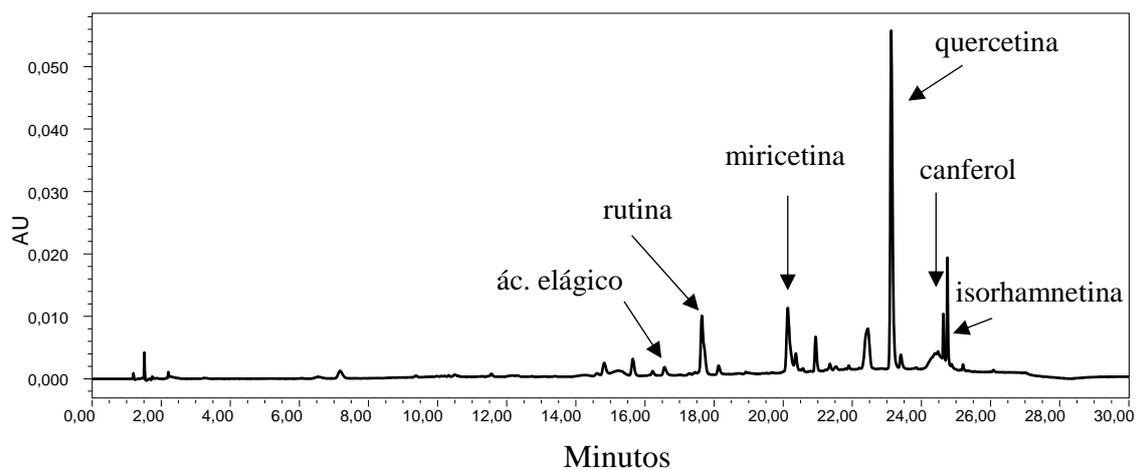


Figura 29: Cromatograma da fração de ácidos fenólicos e flavonoides livres, do bagaço de uva, em 370 nm.

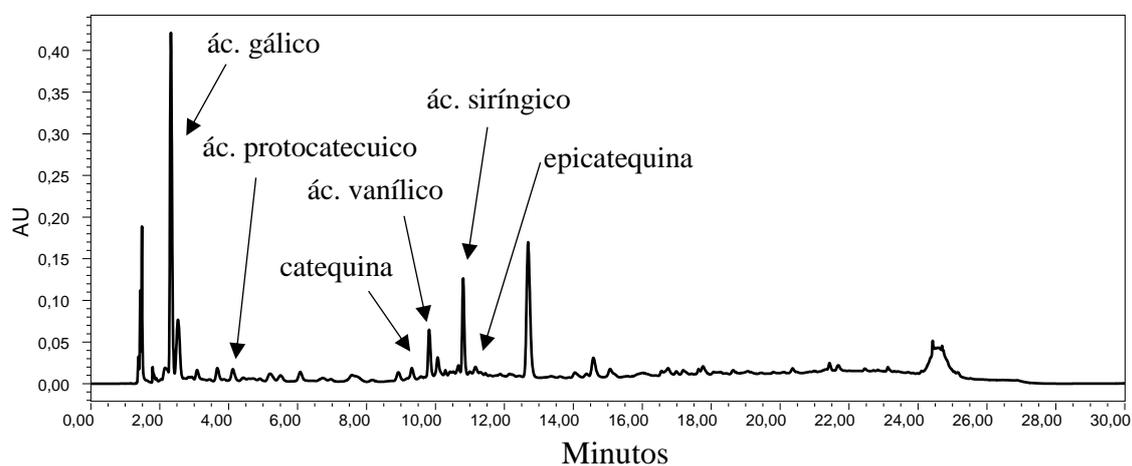


Figura 30: Cromatograma da fração de ácidos fenólicos e flavonoides após hidrólises, do bagaço de uva, em 270 nm.

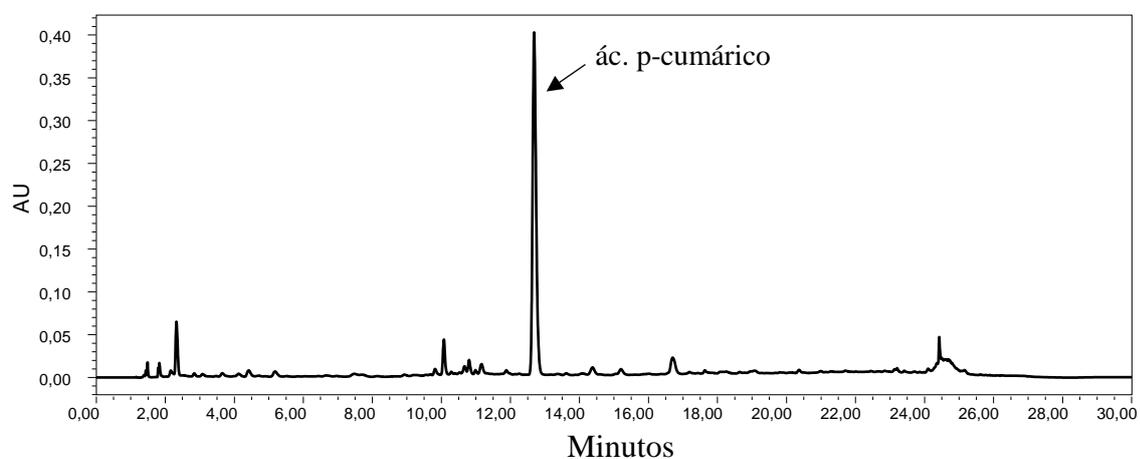


Figura 31: Cromatograma da fração de ácidos fenólicos e flavonoides após hidrólises, do bagaço de uva, em 310 nm.

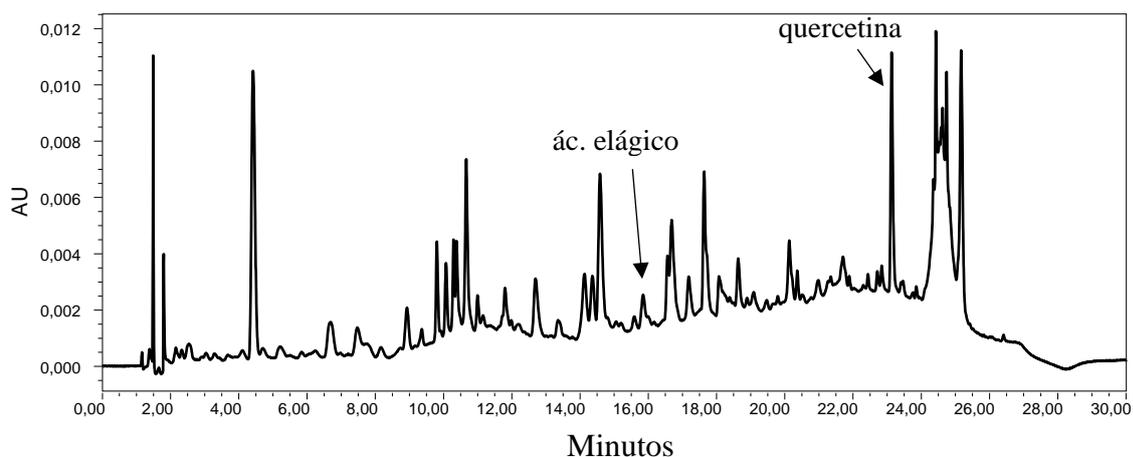


Figura 32: Cromatograma da fração de ácidos fenólicos e flavonoides após hidrólises, do bagaço de uva, em 370 nm.

Para a identificação das substâncias presentes na matriz estudada, foi realizada a comparação com os tempos de retenção (t_R) e os espectros UV-Vis de padrões comerciais. Os espectros das substâncias, que tiveram correspondência com os padrões utilizados, estão ilustrados nas Figuras 33 e 34.

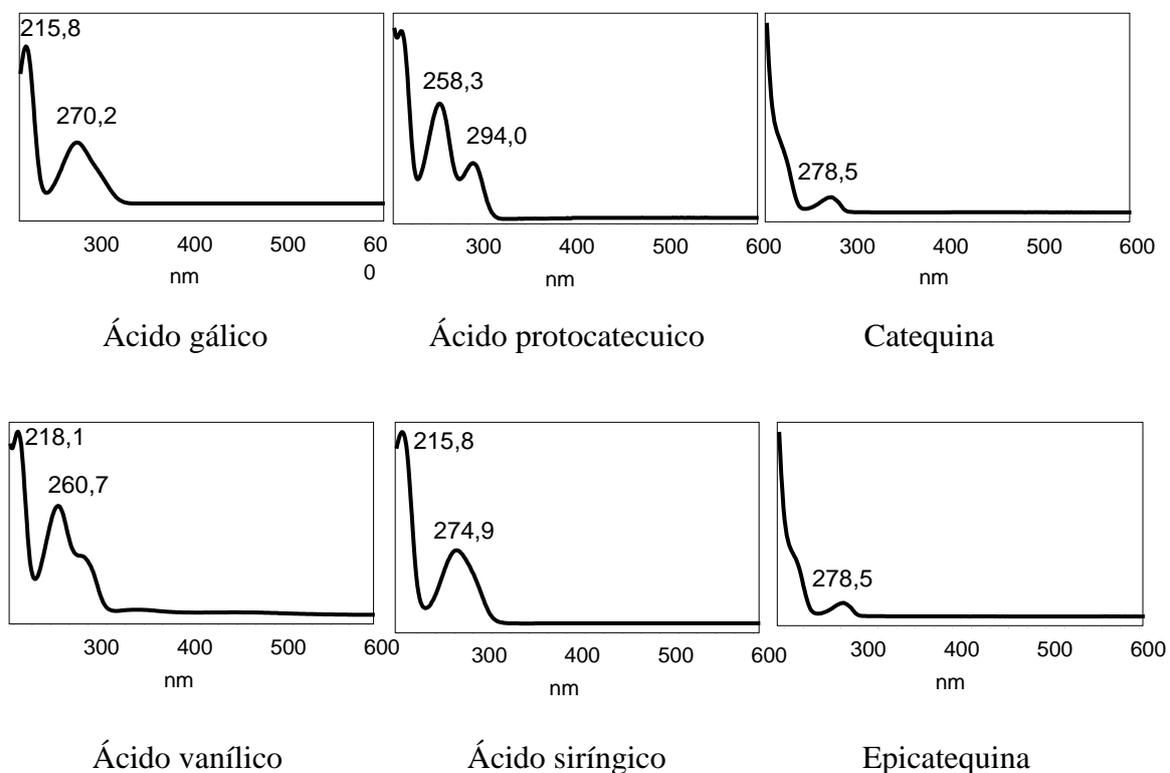


Figura 33: Espectros UV-Vis dos ácidos fenólicos e flavonoides identificados nas amostras.

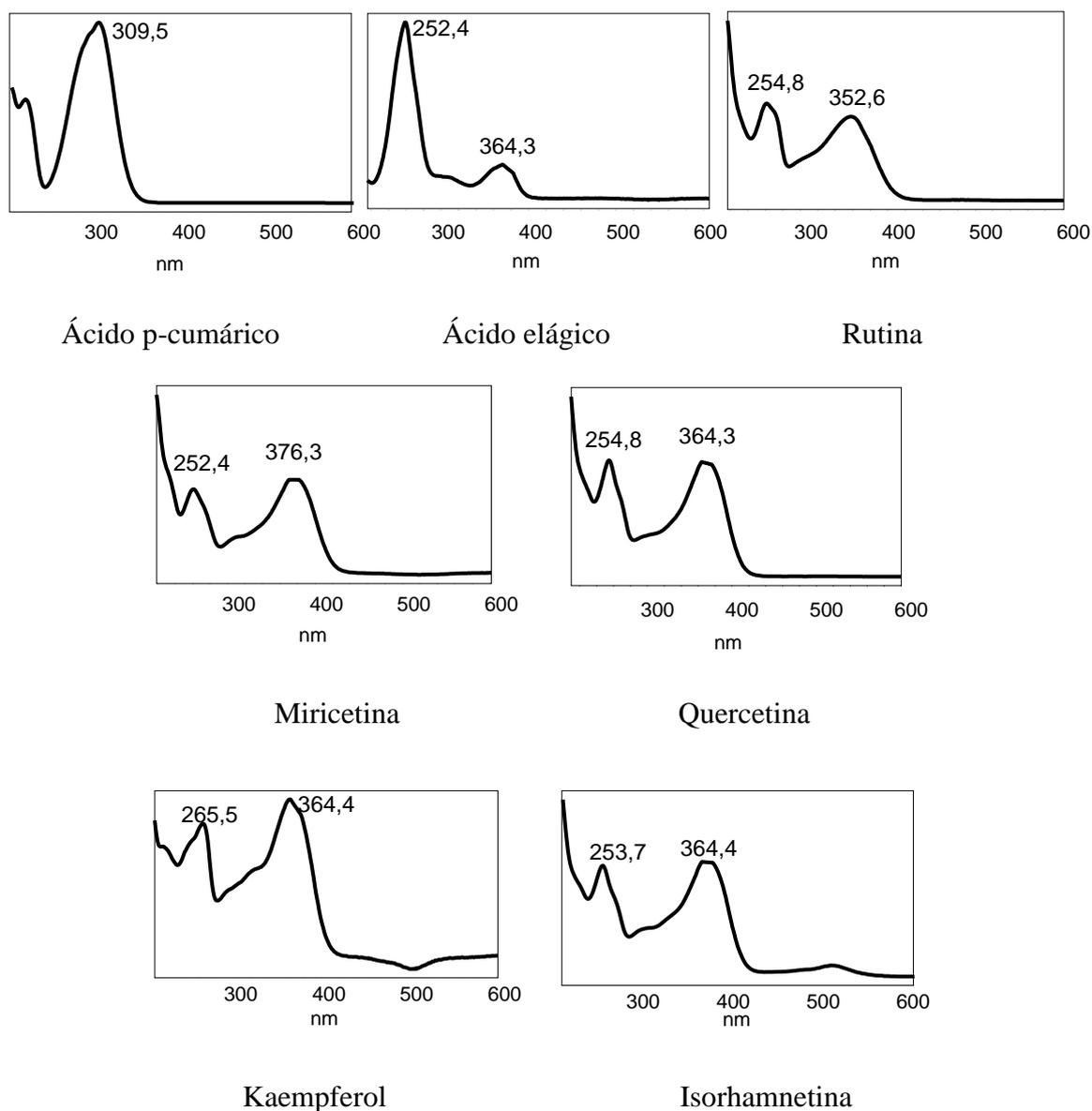


Figura 34: Espectros UV-Vis dos ácidos fenólicos e flavonoides identificados nas amostras.

Com os cromatogramas dos ácidos fenólicos e flavonoides da fração dos fenólicos livres, a partir da comparação com tempos de retenção (t_R) e UV-Vis de padrões, foi possível a identificação das seguintes substâncias: catequina ($t_R = 9,22$ min), epicatequina ($t_R = 11,39$ min), ácido elágico ($t_R = 16,64$ min), rutina ($t_R = 17,61$ min), miricetina ($t_R = 20,0$ min), quercetina ($t_R = 22,99$ min), kaempferol ($t_R = 24,57$ min) e isorhamnetina ($t_R = 24,69$ min). No cromatograma visualizado em 310nm, Figura 28, não foram identificados ácidos fenólicos e flavonoides.

Já com os cromatogramas dos ácidos fenólicos e flavonoides da fração após hidrólises foram identificados ácido gálico ($t_R = 2,14$ min), ácido protocatecuico ($t_R = 3,97$ min), catequina ($t_R = 9,22$ min), ácido vanílico ($t_R = 9,73$ min), ácido siríngico ($t_R = 10,74$ min), epicatequina ($t_R = 11,39$ min), ácido p-cumárico ($t_R = 12,54$ min), ácido elágico ($t_R = 16,64$ min) e quercetina ($t_R = 22,99$ min).

Além da caracterização do bagaço, foi realizada a caracterização do extrato hidroetanólico obtido por ultrassom. As Figuras 35, 36 e 37 apresentam os cromatogramas dos ácidos fenólicos e flavonoides do extrato obtido por ultrassom, visualizados com absorção nos seguintes comprimentos de onda: 270 nm (Figura 35), 310 nm (Figura 36) e 370 nm (Figura 37) nm.

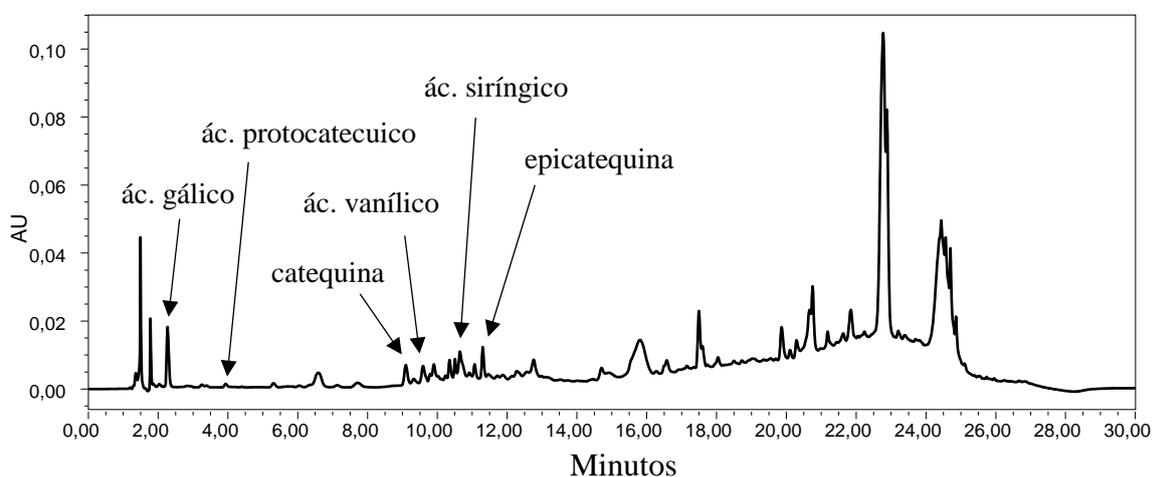


Figura 35: Cromatograma da fração de ácidos fenólicos e flavonoides do extrato ultrassônico, em 270 nm.

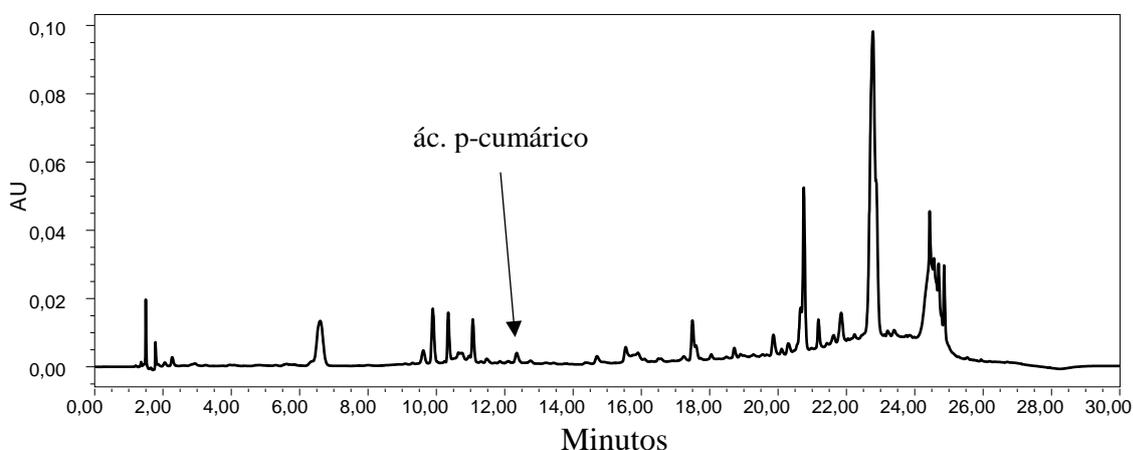


Figura 36: Cromatograma da fração de ácidos fenólicos e flavonoides do extrato ultrassônico, em 310 nm.

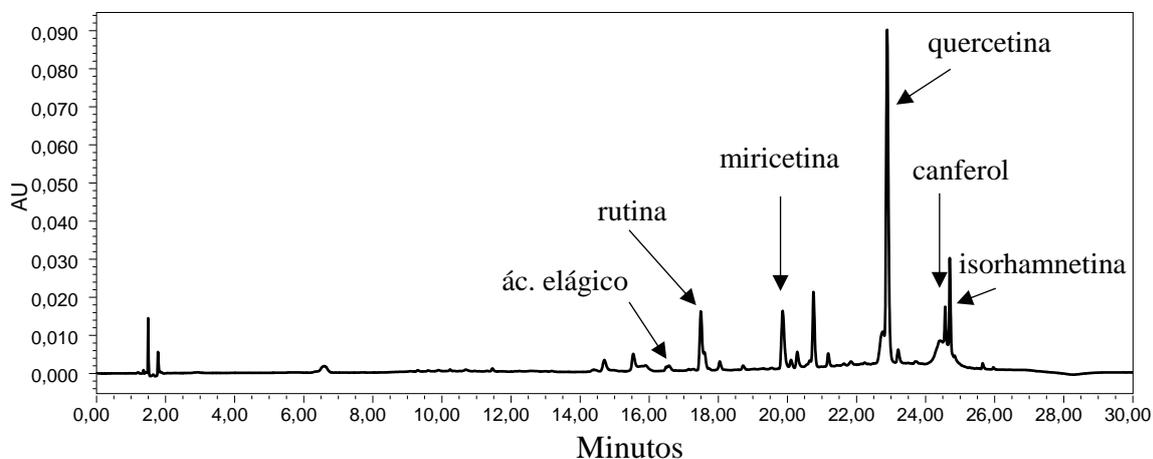


Figura 37: Cromatograma da fração de ácidos fenólicos e flavonoides do extrato ultrassônico, em 370 nm.

Com os cromatogramas dos ácidos fenólicos e flavonoides da fração dos compostos fenólicos livres, a partir da comparação com tempos de retenção (t_R) e UV-Vis de padrões, foi possível a identificação de treze substâncias: ácido gálico ($t_R = 2,14$ min), ácido protocatecuico ($t_R = 3,97$ min), catequina ($t_R = 9,22$ min), ácido vanílico ($t_R = 9,73$ min), ácido siríntrico ($t_R = 10,74$ min), epicatequina ($t_R = 11,39$ min), ácido p-cumárico ($t_R = 12,54$ min), ácido elágico ($t_R = 16,64$ min), rutina ($t_R = 17,61$ min), miricetina ($t_R = 20,0$ min), quercetina ($t_R = 22,99$ min), kaempferol ($t_R = 24,57$ min) e isorhamnetina ($t_R = 24,69$ min).

Melo et al. (2015) identificaram em bagaço de uva Syrah do semiárido os ácidos gálico, siríntrico, e os flavonoides catequina, epicatequina e quercetina-3-glicosídeo.

Lingua et al. (2016) também caracterizaram o perfil de fenólicos de uvas, bagaços de uvas e vinhos de três variedades vermelhas *Vitis vinifera* L. cultivadas na Argentina, inclusive a espécie Syrah. No bagaço de uva Syrah foram identificados os seguintes fenólicos: ácido caftárico, ácido cutárico, etil galato, *trans*-resveratrol, kaempferol, miricetina, laricitrina, siringetina, quercetina, isorhamnetina, miricetina-3-glicosídeo, miricetina-3-cumarilglicosídeo, astilbina, larincitrina-3-glicosídeo, quercetina-3-glicosídeo, siringetina-3-glicosídeo, isorhamnetina-3-glicosídeo, catequina, epicatequina, epicatequina galato, dímero de procianidina, dímero de procianidina galato. No referido estudo foi possível identificar maior número de fenólicos devido à técnica utilizada, que foi o acoplamento de um cromatógrafo líquido

a um espectrômetro de massas, o que favorece a identificação das substâncias, já que não é necessária a etapa de isolamento de substâncias para posterior investigação do material isolado em outra técnica, como o próprio espectrômetro de massas, assim como foi feito no presente trabalho para a identificação de duas antocianinas.

A identificação e quantificação dos ácidos fenólicos e flavonoides presentes tanto no bagaço extraído para caracterização, quanto no extrato obtido por ultrassom está apresentada na Tabela 9, sendo possível identificar e quantificar 13 substâncias. A resposta obtida foi expressa em $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de bagaço, e a quantificação foi realizada utilizando as curvas padrão de cada substância correspondente.

Tabela 9: Teores de ácidos fenólicos e flavonoides ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$) presentes no bagaço de uva Syrah e no extrato obtido por ultrassom.

| Analito | Concentração ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ bagaço) | | | |
|----------------------|--|---------------------|------------------|----------------------|
| | Ácidos fenólicos e flavonoides do bagaço | | | Extrato Ultrassônico |
| | Fração livre | Fração hidrolisados | Soma das frações | |
| Catequina | 54,17±0,66 | 61,2±0,3 | 115,37 | 45,15±0,21 |
| Epicatequina | 52,63±0,55 | 12,57±0,25 | 65,20 | 49,95±0,21 |
| Ácido siríngico | ND | 34,07±1,66 | 34,07 | 8,4±0,85 |
| Ácido vanílico | ND | 16,43±0,35 | 16,43 | 9,45±0,21 |
| Rutina | 41,33±0,49 | ND | 41,33 | 64,2±0 |
| Quercetina | 59,37±1,36 | 3,87±0,11 | 63,23 | 87,3±0 |
| Miricetina | 19,57±0,38 | ND | 19,57 | 17,4±0,42 |
| Kaempferol | 9,43±0,15 | ND | 9,43 | 5,4±0 |
| Isorhamnetina | 13,33±0,23 | ND | 13,33 | 11,1±0 |
| Ácido gálico | ND | 84,1±2,6 | 84,1 | 18,6±0 |
| Ácido protocatecuico | ND | 3,63±0,21 | 3,63 | 0,9±0 |
| Ácido p-cumárico | ND | 78,57±5,81 | 78,57 | 2,1±0,42 |
| Ácido elágico | 3,21±0,32 | 0,31±0,053 | 3,52 | 3±0 |
| Total | 253,05 | 294,74 | 547,79 | 322,95 |

* ND: não detectado; Média ± desvio padrão, n = 3; Total: Soma dos ácidos fenólicos e flavonoides identificados.

Uma vez que a extração para caracterização de ácidos fenólicos e flavonoides escolhida obtém a maior quantidade destas substâncias por utilizar solventes orgânicos, além de hidrolisar com ácido e base, considera-se que esta análise extrai 100% de ácidos fenólicos e flavonoides da amostra, permitindo assim calcular a eficiência da extração ultrassônica, que neste caso foi de aproximadamente 59%.

Como não há uma metodologia de análise padronizada para a extração de todos os fenólicos presentes em alimentos (ANGELO e JORGE, 2007), ao comparar a extração hidroetanólica por ultrassom com o método analítico para a caracterização de ácidos fenólicos e flavonoides livres e hidrolisáveis presentes no bagaço por CLAE-DAD, podem ser notadas algumas diferenças.

A quantidade de ácido gálico obtida por ultrassom (US) foi 4,5 vezes menor do que a obtida na análise de ácidos fenólicos e flavonoides hidrolisáveis, porém nos ácidos fenólicos e flavonoides livres não houve detecção de ácido gálico, o que mostra que o US foi capaz de hidrolizar esta substância, bem como os ácidos vanílico, sirínico, protocatecuico e p-cumárico, como observado na Tabela 9. Esta hidrólise pode ter ocorrido devido à energia empregada no processo de extração, pela temperatura atingida durante a extração, que chegou a 80°C no final do processo, o que, mesmo com um curto período de tempo, pode ter influenciado na liberação destes compostos.

De acordo com a Tabela 9, os flavonoides predominantes no extrato obtido por ultrassom foram rutina, quercetina (flavonóis), catequina e epicatequina (flavanóis). Quando comparadas as duas formas de extração, quercetina e rutina foram melhor extraídas por US, cerca de 1,5 vezes mais do que na extração analítica.

Apesar de o US conseguir extrair o ácido p-cumárico, a grande diferença para o teor observado nos ácidos fenólicos hidrolisáveis (37 vezes maior) pode ter ocorrido devido à presença desta substância nas paredes celulares de plantas, que pode ser esterificada em polissacarídeos e lignina ou eterificada em lignina, tornando-se insolúvel em água. A parte esterificada pode ser liberada por saponificação, enquanto a parte eterificada (glicosídeos) pode ser liberada através de tratamento ácido. Entretanto, a parte insolúvel em água pode ser separada da lignocelulose através de tratamentos alcalinos e ácidos. Contudo, são necessárias condições de tratamento extensivas (PEI et al., 2016). Deste modo, o ácido p-cumárico pode ter ficado retido no resíduo da extração ultrassônica.

5.3. Microencapsulação do extrato

5.3.1. Caracterização físico-química e morfológica

5.3.1.1. Umidade

A Tabela 10 apresenta a umidade das amostras produzidas com diferentes agentes encapsulantes.

Tabela 10: Umidade das amostras microencapsuladas com diferentes agentes encapsulantes.

| Amostras | Umidade (%) |
|----------|------------------------|
| MD | 4,61±0,30 ^a |
| MD + GE | 2,35±0,05 ^c |
| MD + GA | 4,32±0,14 ^a |
| MD + WPI | 3,31±0,11 ^b |

Letras minúsculas distintas em cada coluna representam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$). MD = maltodextrina; GE = gelatina; GA = goma arábica; WPI = isolado proteico de soro de leite.

O teor de umidade pode causar mudanças de tamanho de partícula e morfologia nas partículas obtidas por *spray-drying*, além de afetar sua temperatura de transição vítrea (GHARSALLAOUI et al., 2007). Estas mudanças podem interferir nas propriedades de fluxo como resultado de *caking* e aglomeração, e também na retenção de compostos bioativos (ROSENBERG et al., 1985). Quanto maior o teor de água de um produto, maior a mobilidade das moléculas, o que pode favorecer processos como a difusão de oxigênio, por exemplo, aumentando o risco de oxidação do material encapsulado.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10, nota-se que nos extratos microencapsulados com maltodextrina e sua mistura com goma arábica o teor de umidade foi maior do que os observados para as misturas com WPI e gelatina, sendo este último o material que apresentou menor teor de umidade. Mahdavi et al. (2016) revelaram que os tipos de agente encapsulante afetam o teor de umidade, contudo seus resultados foram opostos aos observados no presente trabalho.

A umidade das partículas variou de 2,35 a 4,61%. Estes valores estão na mesma faixa ou inferiores aos teores de umidade observados por Shi et al. (2013), em mel seco

com maltodextrina e WPI (3,1 a 5%); por Rajabi et al. (2015), que observaram teor de umidade entre 2,7 e 5,3%, para compostos bioativos do açafraão microencapsulados utilizando maltodextrina, goma arábica e gelatina como agentes encapsulantes; e por Mahdavi et al. (2016), em extratos de *Berberis vulgaris* microncapsulados com maltodextrina e sua mistura com goma arábica e com gelatina (3 a 4,3%).

Utilizando como parâmetro o padrão convencionado para pós de fármacos secos por *spray drying*, de acordo com a literatura, o teor de umidade aceitável é inferior a 5% (m/m) (RAJABI et al., 2015). Isto porque baixo teor de umidade (<5%) aumenta a estabilidade do produto durante a embalagem e armazenamento (SHISHIR e CHEN, 2017). Portanto, pode-se concluir que todos os extratos obtidos no presente trabalho apresentaram níveis adequados de teor de umidade residual.

5.3.1.2. Compostos fenólicos totais e antocianinas

O teor de compostos fenólicos e antocianinas monoméricas foi determinado logo após a microencapsulação, a fim de se determinar sua retenção após o processo de secagem. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Antocianinas monoméricas, retenção das antocianinas, compostos fenólicos totais e retenção de fenólicos das amostras microencapsuladas com diferentes agentes encapsulantes.

| Amostras | AM (mg.100g ⁻¹) | Retenção de antocianinas (%) | FT (mg.100g ⁻¹) | Retenção de fenólicos (%) |
|----------|--------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| MD | 224,4±0,6 ^a | ≈100 | 1.602,2±94 ^b | 80 |
| MD + GE | 195,5±5,5 ^b | 90 | 2.318,1 ±46 ^a | ≈100 |
| MD + GA | 182,5 ±3,7 ^b | 85 | 1.799,4±38 ^b | 90 |
| MD + WPI | 199,7±17,8 ^{ab} | 95 | 2.398,0±189 ^a | ≈100 |

Letras minúsculas distintas em cada coluna representam diferença significativa entre as amostras (p<0,05). MD = maltodextrina; GE = gelatina, GA = goma arábica; WPI = isolado proteico de soro de leite.

De acordo com a Tabela 11, a maltodextrina foi o agente encapsulante que resultou na maior retenção de antocianinas logo após a microencapsulação, bem como sua mistura com WPI.

No estudo de Murali et al. (2014), a maltodextrina também mostrou-se um agente encapsulante com boa retenção de antocianinas em suco de cenoura preta, em comparação com goma arábica e fécula de mandioca.

Moser et al. (2017a) obtiveram resultado semelhante na retenção de antocianinas com a mistura de MD + WPI ao microencapsularem suco de uva, observando que a retenção variou de 77,9 a 94%.

Apesar de a retenção das antocianinas das amostras MD + GA e MD + GE ter sido menor, ainda assim estes valores foram considerados altos (85 e 90%, respectivamente) e os materiais foram considerados adequados para a microencapsulação do extrato.

Entre os agentes encapsulantes testados por Mahdavi et al. (2016) na microencapsulação de *Berberis vulgaris*, a combinação de MD + GA com relação núcleo/parede de 25% levou à maior eficiência de encapsulação em relação à combinação MD + GE e apenas MD, proporcionando uma melhor proteção dos pigmentos antocianínicos extraídos deste fruto.

Para os compostos fenólicos totais, maior retenção foi observada quando utilizada a combinação de maltodextrina com proteínas (GE e WPI).

A vantagem de utilizar gelatina é que este polímero pode promover a liberação gradual dos compostos encapsulados, uma vez em contato com água, e a taxa dependerá da porosidade do encapsulado (CELLI et al., 2015).

Segundo Shahidi e Naczk (2003), citado por Mahdavi (2016), os fenólicos e flavonóis podem formar complexos com polissacarídeos e a afinidade destas substâncias depende da solubilidade em água, tamanho molecular, capacidade de conformação e forma do polifenol. Ozdal et al. (2013) descreveram que algumas proteínas também são capazes de formar complexos com compostos fenólicos, e que estas ligações podem ser reversíveis e irreversíveis, dependendo do pH, da temperatura e do tipo e concentração de proteínas e fenólicos.

A interação proteína-fenólico é afetada pelos tipos de proteínas, podendo se ligar de forma hidrofóbica ou hidrofílica dependendo dos locais de ligação da proteína, e também pelo tipo de fenólico, dependendo de fatores como o peso molecular, metilação, hidroxilação, glicosilação e hidrogenação de compostos fenólicos. Entretanto, o mecanismo da influência das proteínas nos compostos fenólicos ainda não é conhecido (OZDAL et al., 2013).

Deste modo, as interações ocorridas entre os compostos fenólicos e os agentes encapsulantes utilizados podem ser responsáveis pelos valores de retenção observados.

5.3.1.3. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante das partículas produzidas com os diferentes agentes encapsulantes está apresentada na Figura 38. De acordo com o método ORAC, as partículas produzidas com a mistura de maltodextrina e gelatina foram as que apresentaram maior atividade antioxidante, seguidas pelas produzidas com a mistura com goma arábica, enquanto as produzidas apenas com maltodextrina ou sua mistura com WPI não apresentaram diferenças significativas entre si.

Por outro lado, no caso do método ABTS, as partículas produzidas com os agentes encapsulantes proteicos (WPI e gelatina) apresentaram valores de atividade antioxidante muito inferiores, o que está de acordo com o descrito por Ozdal et al. (2013), que relataram que as proteínas diminuem significativamente a capacidade sequestrante de radicais, mas há resultados contraditórios, devido ao uso de diferentes metodologias para medir a capacidade antioxidante ou o conteúdo de fenólicos. Como os métodos de análise de atividade antioxidante trabalham com diferentes mecanismos, um único método não determina corretamente todos os compostos antioxidantes disponíveis na matriz (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2008). Contudo, existem poucos estudos sobre o efeito das interações fenólico-proteínas em fenólicos individuais, que podem afetar a capacidade antioxidante dos analitos, necessitando de mais investigações para melhor entender os mecanismos envolvidos, utilizando métodos mais abrangentes que forneçam informações detalhadas sobre as interações de proteínas e compostos fenólicos, como o uso de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (OZDAL et al., 2013).

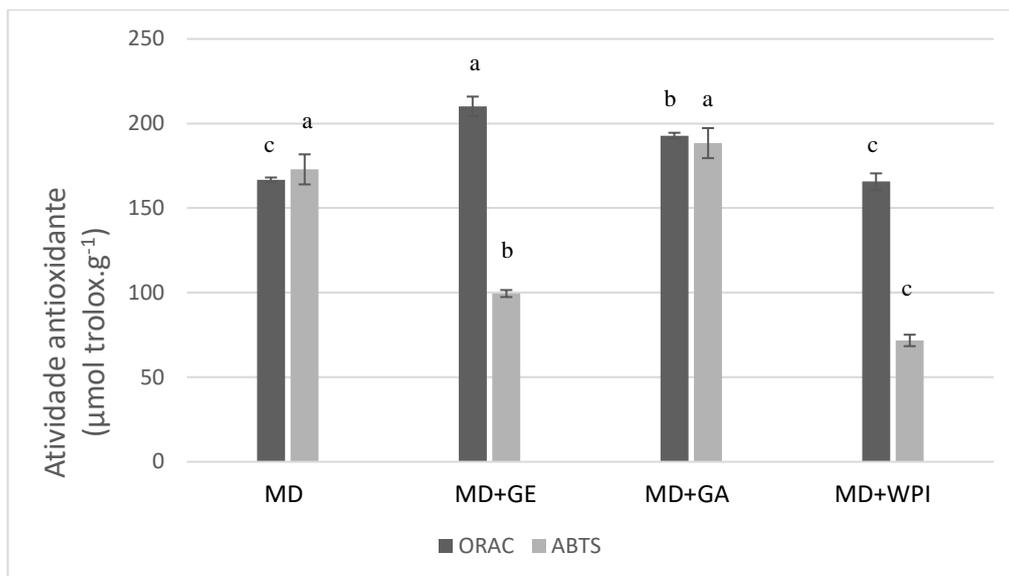


Figura 38: Atividade antioxidante, por ABTS e ORAC, dos extratos microencapsulados por *spray drying*. Letras minúsculas distintas para cada tipo de barra representam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$). MD = maltodextrina; GE = gelatina, GA = goma arábica; WPI = isolado proteico de soro de leite.

5.3.1.4. Distribuição do tamanho de partículas

Segundo Shi et al., (2013), o tamanho de partícula é um dos parâmetros físicos mais importantes de pós, já que podem influenciar as propriedades essenciais dos produtos alimentares, como o aroma, a textura e a aparência.

A análise de distribuição do tamanho de partículas foi realizada para as amostras produzidas com os diferentes agentes encapsulantes. As partículas de todos os pós apresentaram distribuição de tamanho unimodal, porém com tamanhos distintos de partículas. A distribuição de tamanho de partícula dos extratos microencapsulados por *spray drying* está apresentada na Figura 39. O diâmetro médio (D[50]), o *span* e a faixa de variação do diâmetro das partículas estão exibidos na Tabela 12.

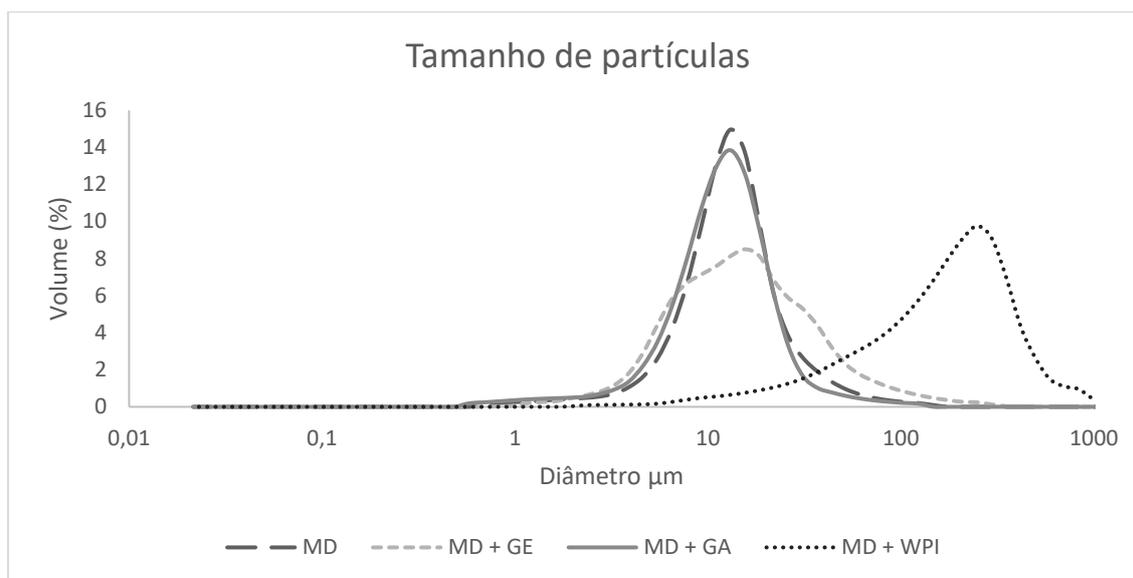


Figura 39: Distribuição do tamanho de partículas do pó produzidos com maltodextrina (MD); maltodextrina e gelatina (MD+GE); maltodextrina e goma arábica (MD + GA); maltodextrina e isolado proteico de soro de leite (MD + WPI).

Tabela 12: Variação do diâmetro médio dos extratos microencapsulados, *span* e diâmetro das partículas.

| Amostra | Diâmetro médio | <i>Span</i> | Faixas de diâmetros |
|---------|-------------------------|--------------------|----------------------------------|
| | D[50] (μm) | | das partículas (μm) |
| MD | 14,9 ^a | 1,49 ^b | 0,688 a 148 |
| MD+GE | 17,4 ^a | 2,39 ^a | 0,818 a 352 |
| MD+GA | 12,9 ^a | 1,66 ^{ab} | 0,578 a 124,5 |
| MD+WPI | 216,4 ^b | 2,16 ^{ab} | 1,64 a 1.674 |

Letras minúsculas distintas em cada coluna representam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$). MD = maltodextrina; GE = gelatina, GA = goma arábica; WPI = isolado proteico de soro de leite.

De acordo com a Tabela 12, um diâmetro médio muito superior foi obtido quando se utilizou isolado proteico de soro de leite na composição do agente encapsulante do extrato microencapsulado, apresentando uma mistura de partículas com diâmetros entre 1,64 e 1.674 μm . Já as partículas produzidas com os outros agentes encapsulantes não apresentaram diferença significativa entre si, em relação ao diâmetro médio.

Pang et al., (2014) também observaram em seu trabalho que o tamanho de partícula de pós encapsulados com WPI foi notavelmente maior em comparação com o pó encapsulado com maltodextrina, ao microencapsularem extrato das folhas de *Orthospihon stamineus*. No entanto, o tamanho observado para o WPI obteve uma média de 9,30 μm , valor muito inferior ao relatado no presente trabalho.

A presença de partículas maiores pode ser atribuída ao início do processo de aglomeração de partículas no secador, onde a formação de pontes de hidrogênio pode ter levado à produção de partículas com maior tamanho (SHI et al., 2013). Além disso, a amostra pode não ter sido dispersa uniformemente durante a análise.

A uniformidade das partículas foi medida pelo parâmetro *span*, com base nos tamanhos das partículas em 3 distribuições diferentes (10%, 50% e 90%). Para que a distribuição do tamanho possa ser considerada como homogênea, o valor de *span* deve ser inferior a 1 (ISMAIL et al., 2016). Dessa forma, nota-se que todos os extratos microencapsulados apresentaram grande intervalo de distribuição, indicando heterogeneidade nas partículas produzidas.

A observação da presença de partículas de tamanhos variados é geralmente relatada para partículas produzidas por *spray drying* (ANANDHARAMAKRISHNAN e ISHWARYA, 2015; MORENO et al., 2016), e pode representar um ponto positivo, uma vez que as partículas menores podem penetrar nos espaços entre os maiores, ocupando menos espaço durante o armazenamento e estocagem.

5.3.1.5. Morfologia

As imagens obtidas na análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos extratos microencapsulados estão apresentadas na Figura 40.

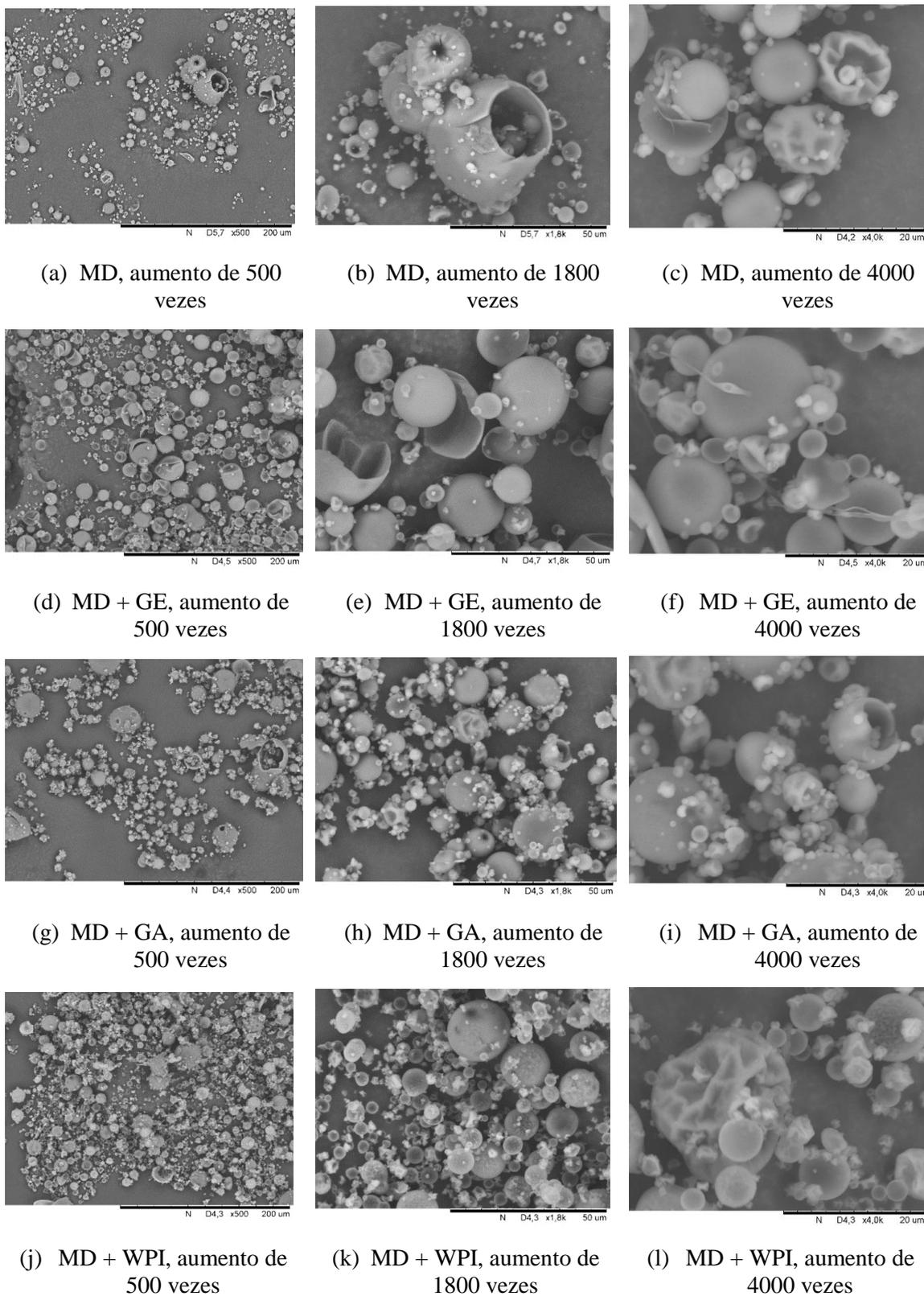


Figura 40: Imagens das partículas resultantes da microencapsulação do extrato de bagaço de uva com os diferentes agentes encapsulantes.

Em todas as amostras foi observada a presença de partículas esféricas, algumas lisas e outras com superfícies enrugadas. Alguns danos foram observados nas superfícies

de partículas maiores, que podem resultar em um aumento de sua área superficial, e, conseqüentemente, em uma menor proteção ao material encapsulado, que fica mais exposto ao ambiente (RÉ, 1998).

Gharsallaoui et al. (2010) observaram que nas misturas de proteínas / carboidratos, as proteínas servem como agentes emulsionantes e formadores de película, enquanto os polissacarídeos atuam como material formador de matriz.

Apesar de a análise de tamanho de partícula os extratos microencapsulados com isolado proteico de soro de leite terem apresentado tamanhos consideravelmente superiores às demais amostras, essa diferença não foi evidente pela análise de microscopia. Desta forma, o grande valor de diâmetro médio observado podem estar relacionado à aglomeração causada quando se utilizou WPI como agente encapsulante, o que pode ser observado na Figura 40. Resultado semelhante foi observado por Moser et al. (2017a), que atribuíram esta característica à possível aderência do material.

Ainda no estudo de Moser et al. (2017a), os autores também observaram a presença de partículas não esféricas e algumas com superfície enrugada, embora não houvesse evidências de poros aparentes com a mistura de MD e WPI. Os autores inferiram que as irregularidades observadas na superfície da partícula foram devido à presença de proteínas nas formulações do veículo.

Os resultados obtidos por Mahdavi et al. (2016) mostraram que as microcápsulas obtidas a partir de GA + MD foram lisas, mas não uniformes, com aglomeração mínima e dentes na superfície, enquanto as de GE + MD e MD estavam em forma quebradiça e apresentaram “dentes” na superfície, mostrando o encolhimento e mais aglomerados.

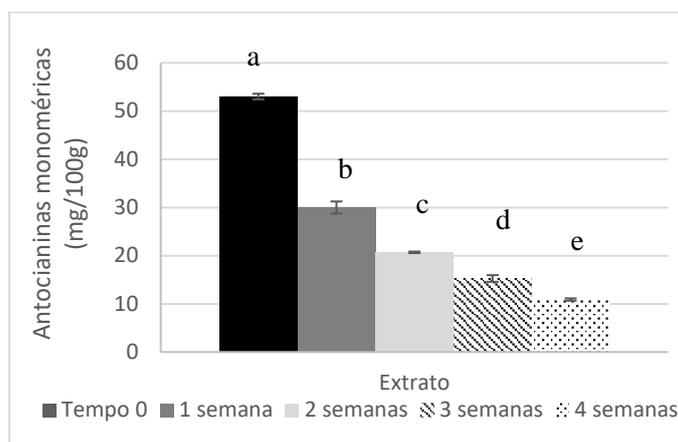
5.3.2. Estabilidade à estocagem

As partículas obtidas pela microencapsulação por *spray drying* do extrato fenólico estão apresentadas na Figura 41.

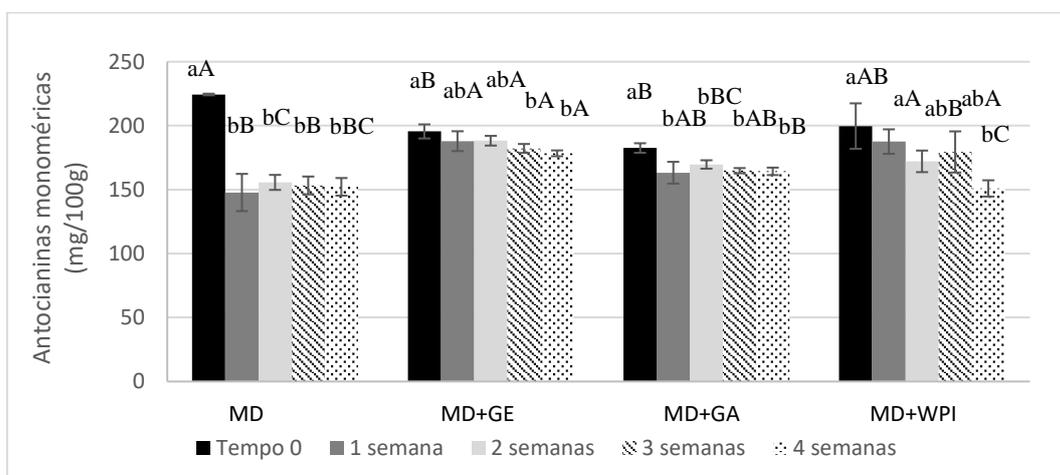


Figura 41: Extrato microencapsulado com maltodextrina (MD), maltodextrina e goma arábica (MD+GA), maltodextrina e gelatina (MD+GE) e maltodextrina e isolado proteico de soro de leite (MD+WPI).

Os resultados das análises de antocianinas monoméricas, fenólicos totais e atividade antioxidante, realizadas ao longo da estocagem a 40°C do extrato ultrassônico líquido e dos microencapsulados por *spray drying*, estão apresentados nas Figuras 42, 43 e 44.

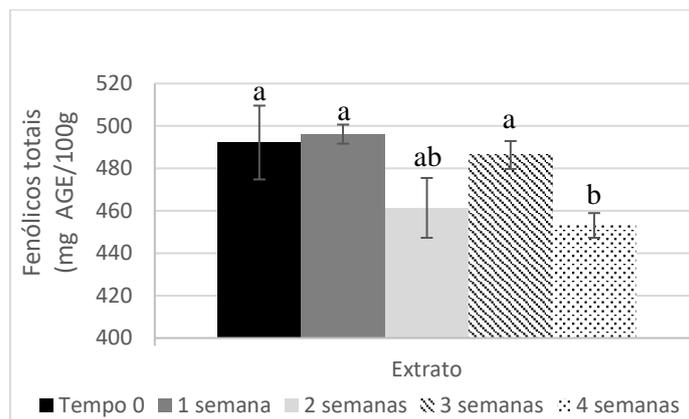


(a)

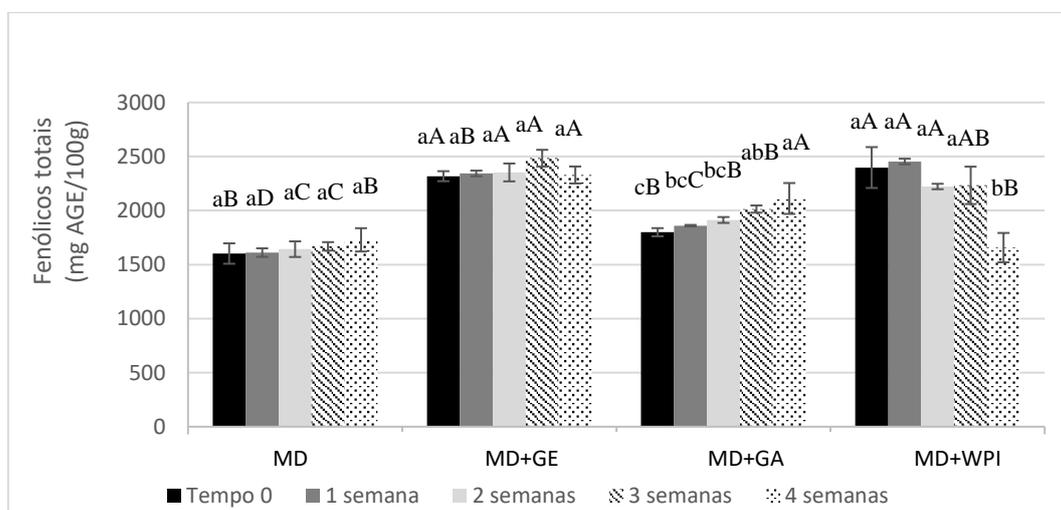


(b)

Figura 42: Antocianinas monoméricas obtidas no extrato líquido (a) e nos microencapsulados por *spray drying* (b), armazenados a 40°C. Letras minúsculas distintas para cada amostra representam diferença significativa para diferentes tempos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas para cada tempo representam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$). MD = maltodextrina; GE = gelatina, GA = goma arábica; WPI = isolado proteico de soro de leite.

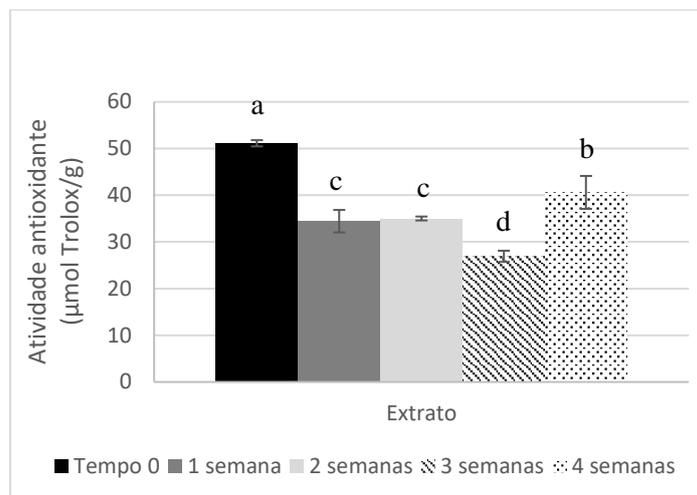


(a)

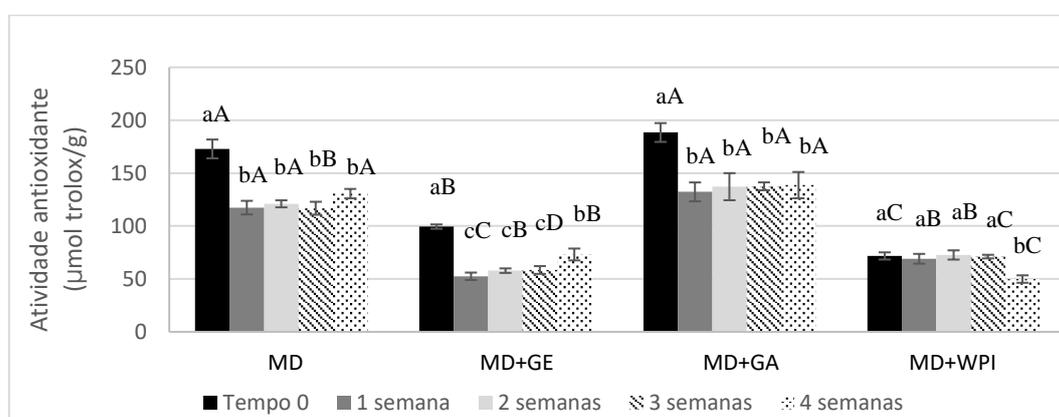


(b)

Figura 43: Fenólicos totais obtidos no extrato líquido (a) e nos microencapsulados por *spray drying* (b), armazenados a 40°C. Letras minúsculas distintas para cada amostra representam diferença significativa para diferentes tempos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas para cada tempo representam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$). MD = maltodextrina; GE = gelatina, GA = goma arábica; WPI = isolado proteico de soro de leite.



(a)



(b)

Figura 44: Atividade antioxidante por ABTS obtida no extrato líquido (a) e nos microencapsulados por *spray drying* (b), armazenados a 40°C. Letras minúsculas distintas para cada amostra representam diferença significativa para diferentes tempos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas para cada tempo representam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$). MD = maltodextrina; GE = gelatina, GA = goma arábica; WPI = isolado proteico de soro de leite.

Durante o armazenamento a 40°C, quando comparados os teores de antocianinas monoméricas dos pós e do extrato líquido, observa-se que o extrato líquido apresentou uma redução significativa a cada semana, sendo reduzido a 54,5% do valor inicial, após 4 semanas de estocagem.

As partículas produzidas com MD e MD + GA apresentaram um decaimento significativo no teor de antocianinas monoméricas após a primeira semana de estocagem (cerca de 41% e de 14%, respectivamente), o que pode indicar a presença de partículas não encapsuladas, ou seja, antocianinas mais superficiais no material encapsulado, estando menos protegidas, o que leva a uma degradação mais rápida das

mesmas. Contudo, após a primeira semana, ambas as partículas se mantiveram estáveis. Já os extratos em pó secos com MD+GE e MD+WPI se mantiveram estáveis durante as primeiras semanas e só apresentaram decaimento no teor de antocianinas ao final da estocagem (cerca de 6,9% e 21% do valor inicial, respectivamente).

De Souza e colaboradores (2014) avaliaram a estabilidade das antocianinas em extratos de bagaço de uva Bordo, comparando o extrato microencapsulado com maltodextrina como agente encapsulante em concentrações de 10, 20 e 30%, com o extrato liofilizado e o extrato líquido. As antocianinas nas amostras microencapsuladas por *spray drying* apresentaram melhor estabilidade durante o armazenamento, em relação aos extratos líquidos e liofilizados.

Fang e Bhandari, também usando maltodextrina como agente encapsulante, microencapsularam bayberry por *spray drying*, verificando perdas de antocianinas de cerca de 7-27% após 6 meses de armazenamento a 4 °C, enquanto a redução do teor de antocianinas a 25 °C variou de 9 a 37%.

Idham et al. (2012) investigaram a estabilidade das antocianinas na microencapsulação de *Hibiscus sabdariffa* L. com maltodextrina, goma arábica e sua mistura como agentes encapsulantes, durante o armazenamento sob temperaturas de armazenamento de 4, 25 e 37°C por 105 dias. Os autores observaram que a estabilidade foi maior na combinação de maltodextrina e goma arábica, proporcionando maior vida de prateleira e menor alteração na cor do pigmento.

Em relação ao teor de fenólicos totais, no geral nenhuma tendência foi observada e tanto o extrato líquido quanto os encapsulados foram estáveis durante o armazenamento, com exceção do produzido com MD + WPI, que apresentou uma redução significativa na última semana de estocagem, o que está de acordo com o observado por Fang e Bhandari (2011), que observaram que as antocianinas foram mais facilmente degradadas em relação a outros compostos fenólicos. Os autores observaram decréscimo no teor de compostos fenólicos totais de cerca de 6–8%, na estocagem a 4°C; 6–9%, na estocagem a 25°C; e 7–37%, na estocagem a 40°C; em suco de bayberry encapsulado com maltodextrina (DE 10) e armazenado por 6 meses, sob diferentes temperaturas e atividades de água.

Moser et al. (2017b) avaliaram a estabilidade de compostos fenólicos de suco de uva BRS Violeta, microencapsulado com mistura de maltodextrina com concentrado proteico de soro de leite e com isolado proteico de soja, armazenado por 150 dias a 5, 25 e 35° C. Os autores observaram que o teor de hidroxicinamato diminuiu para todos

os tratamentos, independentemente da temperatura de armazenamento, e os flavanóis diminuíram a 35 ° C.

A atividade antioxidante apresentou uma redução pronunciada após a primeira semana para todas as amostras (38,9% para MD, 50% para MD + GE e 33,8% para MD + GA), exceto para a produzida com MD + WPI que, embora tenha apresentado um valor inicial menor, foi mais estável ao longo da estocagem. Este comportamento foi semelhante ao observado para o teor de antocianinas, indicando que estes compostos podem estar diretamente relacionados à atividade antioxidante medida pelo método ABTS. No trabalho de Moser et al. (2017b), a atividade antioxidante dos microencapsulados não foi influenciada pelo tempo.

6. CONCLUSÕES

O ultrassom mostrou-se uma alternativa promissora para extração de compostos fenólicos totais e de antocianinas totais presentes no bagaço de uva, permitindo a obtenção de extratos ricos nesses compostos.

Para todas as respostas avaliadas no planejamento experimental (compostos fenólicos totais, teor de antocianinas monoméricas e atividade antioxidante), as extrações mais eficientes ocorreram com uma menor razão sólido/líquido, potências de ultrassom mais altas e com o aumento da concentração de ácido.

A extração assistida por ultrassom utilizando etanol/água (50%) como solvente foi capaz de extrair 85% das antocianinas monoméricas totais extraídas pelo método utilizado para caracterização por CLAE-DAD e cerca de 60% dos ácidos fenólicos e flavonoides totais extraídos pelo método utilizado para caracterização destas substâncias também por CLAE-DAD.

O processo de *spray drying* mostrou-se eficiente na microencapsulação de compostos fenólicos do extrato microencapsulado com diferentes agentes encapsulantes, que foram capazes de reter os compostos fenólicos e antocianinas e preservá-los mais eficientemente do que o extrato líquido.

7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Aplicação dos extratos microencapsulados em produtos alimentícios, com a função de corantes ou antioxidantes naturais;
- Avaliação da estabilidade do extrato em diferentes condições de pH;
- Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos;
- Avaliação do perfil de ácidos fenólicos, flavonoides e antocianinas dos pós por CLAE-DAD;
- Avaliação das funções biológicas dos compostos majoritários do extrato.

8. PUBLICAÇÕES

- Anais de congressos:

1) Efeito das condições de processo na extração assistida por ultrassom de fenólicos do bagaço de UV

K.E.L. Mazza, A.S.C. Teles, T.W. Caldas, A.I.S. Brígida, R.G. Borguini, R.V. Tonon
(XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos)

2) *Effect of ultrasound-assisted extraction process on the antioxidant activity of grape pomace extracts*

K.E.L. Mazza, T.W. Caldas, E.F. Souza, A.I.S. Brígida, R.G. Borguini, R.V. Tonon
(*First International Workshop Bioactive Compounds*)

- Artigos em periódicos:

1) *Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods*

T.W. Caldas, K.E.L. Mazza, A.S.C. Teles., G.N. Mattos, A.I.S. Brígida, C.A. Conte-Junior, R.G. Borguini, R.O. Godoy, L.M.C. Cabral, R.V. Tonon
(Submetido à revista *Industrial Crops and Products*)

2) *Effect of processing conditions on the ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from grape pomace*

K.E.L. Mazza, E.F. Souza, M. P. A. Santiago, L.S.M. Nascimento, A.I.S. Brígida, R.G. Borguini, R.O. Godoy, R.V. Tonon
(Em redação, a ser submetido à revista *Ultrasonics Sonochemistry*)

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA-ESTRADA, B.A., GUTIÉRREZ, J.A., SERNA-SALDÍVAR. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, v. 152, p. 46-55, 2014.
- AL-DHABI, N. A., PONMURUGAN, K., JEGANATHAN, M. P. Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 206–213, 2017.
- ALI, K., MALTESE, F., CHOI, Y. H., VERPOORTE, R. Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 3, p. 357-378, 2010.
- ANANDHARAMAKRISHNAN, C. ISHWARYA, S. P. **Spray drying techniques for food ingredient encapsulation**, John Wiley Sons, 2015. 312 p.
- ANGELO, P. M., JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.
- ANTONIOLLI, A. FONTANA, A. R. PICCOLI, P. BOTTINI, R. Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. **Food chemistry**, v. 178, p. 172-178, 2015.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis. 20ed. Washington, USA, 2016.
- ARTS, M. J. T. J., HAENEN, G. R. M. M., WILMS, L. C., BEETSTRA, S. A. J. N., HEIJNEN, C. G. M., VOSS, H. P., BAST, A. Interactions between flavonoids and proteins: Effect on the total antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 5, p. 1184–1187, 2002.
- BAKOWSKA-BARCZAK, A. Acylated Anthocyanins as Stable, Natural Food Colorants – A Review. **Pol. J. Food Nutr. Sci.**, v. 14, n. 2, p. 107–115, 2005.
- BARBA, F. J., ZHU, Z., KOUBAA, M., SANT'ANA, A. S., ORLIEN, V. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 49, p. 96–109, 2006.
- BAYDAR, N. G. ÖZKAN, G. ÇETIN, E. S. Characterization of grape seed and pomace oil extracts. *Grasas y aceites*, v. 58, n. 1, p. 29-33, 2007.

BOONCHU, T., UTAMA-ANG, N. Optimization of extraction and microencapsulation of bioactive compounds from red grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 2, p. 783-792, 2015.

BORGIGNON L. C. JR, FRANCESCATTO, V., NIENOW, A. A., CALVETE, E., REGINATTO, F. H. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 183–188, 2009.

BUCIĆ-KOJIĆ, A., PLANINIĆ, M., TOMAS, S., BILIĆ, M., VELIĆ, D. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 236–242, 2007.

BUCIĆ-KOJIĆ, A., PLANINIĆ, M., TOMAS, S., JAKOBEK, L., ŠERUGA, M. Influence of solvent and temperature on extraction of phenolic compounds from grape seed, antioxidant activity and colour of extract. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 12, p. 2394–2401, 2009.

CAMARGO, U.A. MAIA, J.D.G. RITSCHKEK, P. Novas cultivares brasileiras de uva. Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos. EMBRAPA. Documento n. 48. Bento Gonçalves, RS. 2009.

CASAZZA, A. A., ALIAKBARIAN, B., MANTEGNA, S., CRAVOTTO, G., PEREGO, P. Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. **Journal of Food Engineering**, v. 100, n. 1, p. 50–55, 2010.

CASTAÑEDA-OVANDO, A., PACHECO-HERNÁNDEZ, M. D., PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E., RODRÍGUEZ, J. A., GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 859–871, 2009.

CELLI, G. B., GHANEM, A., BROOKS, M. S. Bioactive Encapsulated Powders for Functional Foods — a Review of Methods and Current Limitations. **Food and bioprocess technology**, v. 8, n. 9, p. 1825-1837, 2015.

CHEMAT, F., ROMBAUT, N., SICAIRE, A. G., MEULLEMIESTRE, A., FABIANO-TIXIER, A. S., ABERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 540–560, 2017.

COLLINS, C. H. BRAGA, G. L. BONATO, P. S. **Fundamentos da cromatografia**. – Campinas, SP. Editora da UNICAMP. p. 17-42, 273-397. 2006.

COUTINHO, M. A. S, MUZITANO, M. F., COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

COVINCA. **Syrah**. Disponível em: <<http://covinca.es/vinedos/variedades-de-uva/uva-syrah/>>, acesso em 13 de junho de 2017.

CRAVOTTO, G., CINTAS, P. Power ultrasound in organic synthesis: moving cavitation chemistry from academia to innovative and large-scale applications. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 2, p. 180-196, 2006.

CRUZ, A. P. G. **Recuperação de compostos bioativos a partir de resíduos da indústria vitivinícola**. 2013. 206f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos. Rio de Janeiro.

DAMODARAN, S., PARKIN, K. L., FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. Artmed Editora, 4. ed., Porto Alegre-Brasil, 2010.

DAVIDOV-PARDO, G., AROZARENA, I., MARÍN-ARROYO, M. R. Optimization of a Wall Material Formulation to Microencapsulate a Grape Seed Extract Using a Mixture Design of Experiments. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 4, p. 941–951, 2013.

DE MELLO, Loiva Maria Ribeiro. **Panorama da Vitivinicultura brasileira 2014**. Embrapa Uva e Vinho-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E), 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/9952204/artigo-desempenho-da-vitivinicultura-brasileira-em-2015>>, acesso em 20 de maio de 2017.

DE SOUZA, V. B., FUJITA, A., THOMAZINI, M., DA SILVA, E. R., LUCON, J. F., GENOVESE, M. I., & FAVARO-TRINDADE, C. S Functional properties and stability of spray-dried pigments from Bordo grape (*Vitis labrusca*) winemaking pomace. **Food chemistry**, v. 164, p. 380-386, 2014.

DEGANI, A. L. G., CASS, Q. B., VIEIRA, P. C. **Cromatografia, um breve ensaio**. Química Nova na Escola. n. 7, p. 21-25. 1998.

DESAI, K. G. H., PARK, H. J. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. **Drying technology**, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2ª ed. [S.l.], Editora Wiley. p. 7-8, 149-151, 226-298, 472-473. 2002.

DROSOU, C., KYRIAKOPOULOU, K., BIMPILAS, A., TSIMOGIANNIS, D., KROKIDA, M. A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. **Industrial Crops and Products**, v. 75, p. 141–149, 2015.

EHLENFELDT, M. K., PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2222–2227, 2001.

EZHILARASI, P. N., INDRANI, D, JENA, B. S., ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation of Garcinia fruit extract by spray drying and its effect on bread quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 6, p. 1116–1123, 2014.

FANG, Z., BHANDARI, B. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 1139-1147, 2011.

FAO-OIV 2016. **Table and dried grapes**. Disponível em: <<http://www.oiv.int/public/medias/4911/fao-oiv-grapes-report-flyer.pdf>>, acesso em 06 de junho de 2017.

FDA. 2004. **GRAS Notification for Ethanol**. Memo submitted to FDA on behalf of Frito-Lay, Inc. US Food and Drug Administration. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm268080.pdf>>, acesso em 15 de março de 2017.

FLAMINI, R., MATTIVI, F., DE ROSSO, M., ARAPITSAS, P., BAVARESCO, L. Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: Anthocyanins, stilbenes and flavonols. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 10, p. 19651–19669, 2013.

FLESCHHUT, J., KRATZER, F., RECHKEMMER, G., KULLING, S. E. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. **European Journal of Nutrition**, v. 45, n. 1, p. 7–18, 2006.

FONTANA, A. R. ANTONIOLLI, A. BOTTINI, R. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 8987-9003, 2013.

FRACASSO, D., FUENTEFRIA, A. M., TEIXEIRA, M. L. Avaliação Toxicológica e Quantificação de Agentes Antioxidantes em Vinhos Tintos Comercializados no Município de Concórdia, Santa Catarina, p. 181–189, 2009.

FRAIGE, K., PEREIRA-FILHO, E. R., CARRILHO, E. Fingerprinting of anthocyanins from grapes produced in Brazil using HPLC–DAD–MS and exploratory analysis by principal component analysis. **Food Chemistry**, v. 145, p. 395–403. 2014.

FRIGHETTO, R. T. S. BACCAN, M. Quantificação de ácidos fenólicos constitutivos da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Embrapa Meio Ambiente, 2012. 17 p. — (Documentos / Embrapa Meio Ambiente, 90).

GEORGÉ, S. BRAT, P. ALTER, P. AMIOT, M. J. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.5, p.1370- 1373. 2005.

GHAFOOR, K., CHOI, Y. H., JEON, J. Y., JO, I. H. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 4988–4994, 2009.

GHARSALLAOUI, A., CHAMBIN, O. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview, **Food Research International**, v. 40, p. 1107–1121, 2007.

GIUSTI, M. M., WROLSTAD, R. E. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, n. 3, p. 217–225, 2003.

GIUSTI, M. M., RODRÍGUEZ-SAONA, L. E., WROLSTAD, R. E. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non- acylated pelargonidin-based anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 11, p. 4631–4637, 1999.

GIUSTI, M.M., WORSLTAD, R.E. **Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy**: Current Protocols in Food Analytical Chemistry. John Willey, New York, NY, USA. 2001.

GONZÁLEZ-CENTENO, M. R., COMAS-SERRA, F., FEMENIA, A., ROSSELLÓ, C., SIMAL, S. Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 506–514, 2015.

GONZÁLEZ-CENTENO, M. R., JOURDES, M., FEMENIA, A., SIMAL, S., ROSSELLÓ, C., TEISSEDRE, P.L. Proanthocyanidin composition and antioxidant potential of the stem winemaking byproducts from 10 different grape varieties (*Vitis vinifera* L.). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 48, p. 11850-11858, 2012.

GONZÁLEZ-CENTENO, M. R., KNOERZER, K., SABAREZ, H., SIMAL, S., ROSSELLÓ, C., FEMENIA, A. Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.) – A response surface approach. **Ultrasonics Sonochemistry**, 21, p. –2184, 2014.

GOUVÊA, A. C. M. S, ARAUJO, M. C. P, SHULZ, D. F., PACHECO, S., GODOY, R. L. O., CABRAL, L. M. C. Anthocyanins standards (cyanidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-rutinoside) isolation from freeze-dried açai (Euterpe oleraceae Mart.) by HPLC. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.1, p.1-4, 2012.

GOUVÊA, A.C.M.S. MELO, A., SANTIAGO, M.C.P.A., PEIXOTO, F.M., FREITAS, V., GODOY, R.L.O., FERREIRA, I.M.P.V.O. Identification and quantification of anthocyanins in fruits from *Neomitranthes obscura* (DC.) N. Silveira an endemic specie from Brazil by comparison of chromatographic methodologies. **Food Chemistry**. v.185, p. 277-283, 2015.

GOUVÊA, A.C.M.S. SANTIAGO, M.C.P.A., OLIVEIRA, L.M., GODOY, R.L.O., PEIXOTO, F.M., PACHECO, S., NASCIMENTO, L.S.M., BORGUINI, R.G. Isolamento das antocianinas do epicarpo de uvas-pretas (*Vitis* spp.) por CLAE/DAD e sua identificação através do sistema CLUE-QTOF-ESI/EM/EM. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**. v.6, n.1/2, 2014.

GUERRA, C. C. MANDELLI, F. TONIETTO J. ZANUS M. C. CAMARGO U. A. **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 64 p., 2009.

HATJE, V., COSTA, L. M., KORN, M. G. A., COTRIM, G. Speeding up HCl extractions by employing ultrasound energy to evaluate trace elements bioavailability in sediments. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 5, p. 846-852, 2009.

HE, J., GIUSTI, M. M. High-purity isolation of anthocyanins mixtures from fruits and vegetables – A novel solid-phase extraction method using mixed mode cation-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 1218, p. 7914-7922, 2011.

HERRMANN, K., NAGEL, C. W. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, v. 28, n. 4, p. 315-347, 1989.

HUANG, D., BOXIN, O. U., PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841–1856, 2005.

IDHAM, Z., MUHAMAD, I. I., SARMIDI, M. R. Degradation kinetics and color stability of spray-dried encapsulated anthocyanins from hibiscus sabdariffa l. **Journal of Food Process Engineering**, v. 35, n. 4, p. 522-542, 2012.

ISMAIL, A. F. H., MOHAMED, F., ROSLI, L. M. M., SHAFRI, M. A. M., HARIS, M. S., ADINA, A. B. Spectrophotometric Determination of Gentamicin Loaded PLGA Microparticles and Method Validation via Ninhydrin-Gentamicin Complex as a Rapid Quantification Approach. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. v. 6, n. 1, p. 007-014, 2016.

JACKSON, R.S. 2 - **Grape Species and Varieties**, In Food Science and Technology, Academic Press, San Diego, 2008, Pages 15-49, Wine Science (3ed).

KAMMERER, D. CLAUS, A. CARLE, R. SCHIEBER, A. Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* v. 52, n. 14, p. 4360–4367. 2004.

KATO, C. G., TONHI, C. D., CLEMENTE, E. Antocianinas de Uvas (*Vitis vinifera* L.) Produzidas em Sistema Convencional. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, p. 809–821, 2012.

LANÇAS, Fernando Mauro. **A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas**: finalmente “compatíveis”. *Scientia chromatographica*, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LINGUA, M. S., FABANI, M. P., WUNDERLIN, D. A., BARONI, M. V. In vivo antioxidant activity of grape, pomace and wine from three red varieties grown in Argentina: Its relationship to phenolic profile. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 332–345, 2016.

LOPES, T. J., XAVIER, M. F., GABRIELA, M., QUADRI, N., QUADRI, M. B. Antocianinas: Uma Breve Revisão Das Características Estruturais E Da Estabilidade. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 13, n. 3, p. 291–297, 2007.

MACRAE, R. **A series of monographs: HPLC in food analysis**. Food Science and Technology. Editora Academic Press, 2^a ed. p. 77, 1998.

MAHDAVI, S. A., JAFARI, S. M., ASSADPOOR, E., DEHNAD, D. Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 379–385, 2016.

MATTILA, P. KUMPULAINEN, J. Determination of Free and Total Phenolic Acids in Plant-Derived Foods by HPLC with Diode-Array Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 13, p. 3660-3667. 2002.

MATTILA, P., HELLSTRÖM, J. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3, p. 152-160, 2007.

MELO, P. S., MASSARIOLI, A. P., DENNY, C., DOS SANTOS, L. F., FRANCHIN, M., PEREIRA, G. E., VIEIRA, T. M. F. S., ROSALEN, P. L., DE ALENCAR, S. M. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, v. 181, p. 160–169, 2015.

MERCOSUL. RES Nº 45/96. Resolução Mercosul nº 45, de 21 de junho de 1996. Regulamento Vitivinícola do Mercosul.

MISTRAL. **Syrah/Shiraz**. Disponível em: <<https://www.mistral.com.br/tipo-de-uva/syrah-shiraz>>, acesso em 14 de junho de 2017.

MMA. Caderno da Região Hidrográfica do São Francisco / Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Recursos Hídricos. – Brasília: MMA, 2006.

MORENO, T., DE PAZ, E., NAVARRO, I., RODRÍGUEZ-ROJO, S., MATÍAS, A., DUARTE, C., SANZ-BUENHOMBRE, M., COCERO, M. J. Spray Drying Formulation of Polyphenols-Rich Grape Marc Extract: Evaluation of Operating Conditions and Different Natural Carriers. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 12, p. 2046–2058, 2016.

MOSER, P., SOUZA, R. T. DE, TELIS, V. R. N. Spray Drying of Grape Juice From Hybrid CV. BRS Violeta: Microencapsulation of Anthocyanins Using Protein/Maltodextrin Blends as Drying Aids. **Journal of Food Processing and Preservation**. v. 41, n. 1, 2017a.

MOSER, P., TELIS, V. R. N., DE ANDRADE NEVES, N., GARCÍA-ROMERO, E., GÓMEZ-ALONSO, S., HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Storage stability of phenolic compounds in powdered BRS Violeta grape juice microencapsulated with protein and maltodextrin blends. **Food chemistry**, v. 214, p. 308-318, 2017b.

MURALI, S., KAR, A., MOHAPATRA, D., KALIA, P. Encapsulation of black carrot juice using spray and freeze drying. **Food Science and Technology International**, v. 21, n. 8, p. 604–612, 2014.

NACZK, M., SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in foods. **Journal of Chromatography A**. v.1054, p.95-111, 2004.

NASCIMENTO, L.S.M. **Identificação e quantificação de compostos bioativos em frutos de *Eugenia brasiliensis*, Lam.** 2015. 83 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

NAWAZ, H., SHI, J., MITTAL, G. S., KAKUDA, Y. Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. **Separation and Purification Technology**, v. 48, n. 2, p. 176–181, 2006.

NEO, Y. P. ARIFFIN, A. TAN, C. P. TAN, Y. A. Phenolic acid analysis and antioxidant activity assessment of oil palm (*E. guineensis*) fruit extracts. **Food Chemistry**, v. 122, p. 353–359. 2010.

NIJVELDT, R. J., VAN NOOD, E. L. S., VAN HOORN, D. E., BOELEN, P. G., VAN NORREN, K., VAN LEEUWEN, P. A. Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 4, p. 418–425, 2001.

OIV FOCUS 2017. **Vine Varieties Distribution in The World**. Disponível em: <<http://www.oiv.int/public/medias/5336/infographie-focus-oiv-2017-new.pdf>>, acesso em 08 de junho de 2017.

OLIVEIRA, Daniela Alves de. **Caracterização fitoquímica e biológica de extratos obtidos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) das variedades merlot e syrah**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2010.

OZDAL, T., CAPANOGLU, E., ALTAY, F. A review on protein-phenolic interactions and associated changes. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 954–970, 2013.

PANG, S. F., YUSOFF, M. M., GIMBUN, J. Assessment of phenolic compounds stability and retention during spray drying of *Orthosiphon stamineus* extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 159–165, 2014.

PEI, K., OU, J., HUANG, J., OU, S. p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 9, p. 2952-2962, 2016.

PENG, T., ZHANG, X., HUANG, Y., ZHAO, Z., LIAO, Q., XU, J. Nanoporous mannitol carrier prepared by non-organic solvent spray drying technique to enhance the aerosolization performance for dry powder inhalation, **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. ARRANZ, S. TABERNERO, M. DÍAZ- RUBIO, M. E. SERRANO, J. GOÑI, I. SAURA-CALIXTO, F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. **Food Research International, Darking**, v. 41, n. 3, p. 274–285, 2008.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J., TORRES, J. L. Analysis of nonextractable phenolic compounds in foods: The current state of the art. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 24, p. 12713–12724, 2011.

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

PINGRET, D., FABIANO-TIXIER, A. S., CHEMAT, F. Ultrasound-assisted extraction. **Natural product extraction: principles and applications**, v. 21, p. 89, 2013.

RAJABI, H., GHORBANI, M., JAFARI, S. M., SADEGHI MAHOONAK, A., RAJABZADEH, G. Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin, gum Arabic and gelatin as wall materials. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 327–337, 2015.

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. **Drying technology**, v. 16, n. 6, p. 1195-1236, 1998.

RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.

RIZZON, L.A., DALL'AGNOL, I. **Vinho branco**. Área de Informação da Sede-Col Criar Plantar ABC 500P/500R Saber (INFOTECA-E), 2009.

ROCKENBACH, I. I., da SILVA, G. L., RODRIGUES, E., KUSKOSKI, E. M., FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, 2008.

ROCKENBACH, I. I., RODRIGUES, E., GONZAGA, L. V., CALIARI, V., GENOVESE, M. I., GONÇALVES, A. E. D. S. S., FETT, R. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 174-179, 2011.

ROCKENBACH, I. I., SILVA, G. L., RODRIGUES, L., GONZAGA, L. V. F. Atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva das variedades Regente e Pinot Noir (*Vitis vinifera*). **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 66, n. 2, p. 158-163, 2007.

ROSENBERG, M., KOPELMAN, I. J., TALMON, Y. A scanning electron microscopy study of microencapsulation. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 1, p. 139-144, 1985.

RUBERTO, G., RENDA, A., DAQUINO, C., AMICO, V., SPATAFORA, C., TRINGALI, C., TOMMASI, N. DE. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 203–210, 2007.

RUFINO, M. S. M. D. S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. S. DE, MORAIS, S. M. DE, SAMPAIO, C. G. D. G., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-COLIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. *Comunicado Técnico on Line*, v. 127, p. 0–3, 2007.

SADILOVA, E., CARLE, R., STINTZING, F. C. Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Molecular Nutrition and Food Research*, v. 51, n. 12, p. 1461–1471, 2007.

SAITO, N., KU, M., TATSUZAWA, F., LU, T. S., YOKOI, M., SHIGIHARA, A., HONDA, T. Acylated cyanidin glycosides in the purple-red flowers of *Bletilla striata*. *Phytochemistry*, v. 40, n. 5, p. 1523-1529, 1995.

SANTIAGO, M. C. P. A., GOUVÊA, A.C.M.S., GODOY, R. L. O., OIANO-NETO, J., PACHECO, S., ROSA, J. S. **Adaptação de um método por cromatografia líquida de alta eficiência para análise de antocianinas em suco de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.)**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2010 (Comunicado técnico, 162. Biblioteca: CTAA (FL CTE 0162 UMT)).

SCHAICH, K. M., TIAN, X., XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: a critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of functional foods*, v. 14, p. 111-125, 2015.

SESSA, M., CASAZZA, A. A., PEREGO, P., TSAO, R., FERRARI, G., DONSI, F. Exploitation of Polyphenolic Extracts from Grape Marc as Natural Antioxidants by Encapsulation in Lipid-Based Nanodelivery Systems. *Food and Bioprocess Technology*, v. 6, n. 10, p. 2609–2620, 2013.

SHI, Q., FANG, Z., BHANDARI, B. Effect of Addition of Whey Protein Isolate on Spray-Drying Behavior of Honey with Maltodextrin as a Carrier Material. *Drying Technology*, v. 31, n. 13–14, p. 1681–1692, 2013.

SHISHIR, M. R. I., CHEN, W. Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. *Trends in Food Science and Technology*, v. 65, p. 49–67, 2017.

SIKORA, E., CIEŚLIK, E., LESZCZYŃSKA, T., FILIPIAK-FLORKIEWICZ, A., PISULEWSKI, P. M. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chemistry*, v. 107, n. 1, p. 55-59, 2008.

SILVA, M. V., JUNIOR, B. D., VISENTAINER, J. V. Produção e Caracterização de Maltodextrinas e Sua Aplicação na Microencapsulação de Compostos Alimentícios por Spray Drying. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, v. 16, n. 1, p. 111–126, 2014.

- SIMIĆ, V. M., RAJKOVIĆ, K. M., STOJIČEVIĆ, S. S., VELIČKOVIĆ, D. T., NIKOLIĆ, N., LAZIĆ, M. L., KARABEGOVIĆ, I. T. Optimization of microwave-assisted extraction of total polyphenolic compounds from chokeberries by response surface methodology and artificial neural network. **Separation and Purification Technology**, v. 160, p. 89–97, 2016.
- SIMONAGGIO, D., LEHN, D. N. Diferentes métodos para elaboração de vinho espumante. **Revista Caderno Pedagógico**, v. 11, n. 1, 2014.
- SINGLETON, V. ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, n.3, p.144-158. 1965.
- SKOOG, A.D. WEST, DM. HOLLER, F.J. CROUCH, R.S. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8ª Edição norte-americana. Editora Thomson, São Paulo-SP. p. 728-733, 924-930. 2006.
- SOARES, J. M. LEÃO, P. C. S. A vitivinicultura no semiárido brasileiro. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, Petrolina: Embrapa Semiárido, 756p. 2009.
- SOARES, M., WELTER, L., GONZAGA, L., LIMA, A., MANCINI-FILHO, J., FETT, R. Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 727–732, 2008.
- SOARES, Sergio Eduardo. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.
- SU, D., ZHANG, R., HOU, F., ZHANG, M., GUO, J., HUANG, F., DENG, Y. WEI, Z. Comparison of the free and bound phenolic profiles and cellular antioxidant activities of litchi pulp extracts from different solvents. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 9, 2014.
- SUGIOKA, M. The Relationship Between UV-VIS Absorption and Structure of Organic Compounds. **UV Talk Letter February. Shimadzu**, v. 2, p. 5-6, 2009.
- TIMBERLAKE, C. F. Anthocyanins-Occurrence, extraction and chemistry. **Food Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 69–80, 1980.
- TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, n. 12, p. 1231-1246, 2010.
- VACCARI, N. F. S., SOCCOL, M. C. H., IDE, G. M. Compostos fenólicos em vinhos e seus efeitos antioxidantes na prevenção de doenças. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 8, n. 1, p. 71–83, 2009.

- VALDUGA, E., LIMA, L., DO PRADO, R., PADILHA, F. F., TREICHEL, H. Extraction, spray drying and microencapsulating of “Isabel” grape (*Vitis labrusca*) bagasse anthocyanin. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 32, n. 5, p. 1568–1574, 2008.
- VEDANA, M. I. S., ZIEMER, C., MIGUEL, O. G., PORTELLA, A. C., CANDIDO, L. M. B. Efeito do Processamento na Atividade Antioxidante de Uva, **Alim. Nutr.** v. 19, n. 2, p. 159–165, 2008.
- VENTURINI FILHO, Waldemar Gastoni et al. Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação, mercado. São Paulo: Edgard Blucher, p. 525-550, 2005.
- VILKHU, K., MAWSON, R., SIMONS, L., BATES, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. **Innovative Food Science Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 161-169, 2008.
- VINATORU, M. Ultrasonically assisted extraction (UAE) of natural products some guidelines for good practice and reporting. **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 25, p. 94–95, 2015.
- VOLP, A. C. P., RENHE, I. R., BARRA, K., TRINGUETA, P. C. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista brasileira de nutrição clínica**, v. 23, n. 2, p. 141-149, 2008.
- WANG, L., WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 6, p. 300–312, 2006
- WATERS. How Does High Performance Liquid Chromatography Work?. Disponível em: < http://www.waters.com/waters/pt_BR/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055 locale=pt_BR>, acesso em 01 de julho de 2017.
- YILMAZ, Y., TOLEDO, R. T. Health aspects of functional grape seed constituents. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, n. 9, p. 422–433, 2004.
- ZULUETA, A., ESTEVE, M. J., FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 310-316, 2009.

10. ANEXOS

Tabela 13: Análise de variância (ANOVA) do modelo ajustado para a análise de antocianinas monoméricas dos extratos do planejamento experimental:

| | SQ | GL | MQ | Fcalculado | Ftabelado* |
|------------------|-----------|----|----------|------------|------------|
| Regressão | 42613,222 | 4 | 10653,31 | 17,03 | 3,26 |
| Resíduo: | 7507,581 | 12 | 625,63 | | |
| -Falta de ajuste | 6959,18 | 10 | 695,92 | 2,54 | 19,40 |
| -Erro puro | 548,40 | 2 | 274,20 | | |
| Total | 50120,80 | 16 | | | |

*Valores tabelados de F a $p \leq 0,05$.

SQ = soma quadrática, GL = grau de liberdade, MQ = média quadrática

Tabela 14: Análise de variância (ANOVA) do modelo ajustado para a análise de fenólicos totais dos extratos do planejamento experimental:

| | SQ | GL | MQ | Fcalculado | Ftabelado* |
|------------------|--------------|----|------------|------------|------------|
| Regressão | 25084953,541 | 7 | 3583564,79 | 12,38 | 3,29 |
| Resíduo: | 2605860,257 | 9 | 289540,03 | | |
| -Falta de ajuste | 2530612 | 7 | 361516 | 9,61 | 19,35 |
| -Erro puro | 75249 | 2 | 37624 | | |
| Total | 27690814 | 16 | | | |

*Valores tabelados de F a $p \leq 0,05$.

SQ = soma quadrática, GL = grau de liberdade, MQ = média quadrática

Tabela 15: Análise de variância (ANOVA) do modelo ajustado para a análise de atividade antioxidante por ORAC dos extratos do planejamento experimental:

| | SQ | GL | MQ | Fcalculado | Ftabelado* |
|------------------|-----------|----|---------|------------|------------|
| Regressão | 70631,166 | 9 | 7847,91 | 11,28 | 3,68 |
| Resíduo: | 4869,673 | 7 | 695,67 | | |
| -Falta de ajuste | 4855,37 | 5 | 971,07 | 135,78 | 19,30 |
| -Erro puro | 14,30 | 2 | 7,15 | | |
| Total | 75500,84 | 16 | | | |

*Valores tabelados de F a $p \leq 0,05$.

SQ = soma quadrática, GL = grau de liberdade, MQ = média quadrática

Tabela 16: Análise de variância (ANOVA) do modelo ajustado para a análise de atividade antioxidante por ABTS dos extratos do planejamento experimental:

| | SQ | GL | MQ | Fcalculado | Ftabelado* |
|------------------|----------|----|--------|------------|------------|
| Regressão | 92642,9 | 10 | 9264,3 | 5,94 | 19,4 |
| Resíduo: | 3118,5 | 2 | 1559,2 | | |
| -Falta de ajuste | 372388,6 | 16 | 23274 | 3254,4 | 19,43 |
| -Erro puro | 14,30 | 2 | 7,15 | | |
| Total | 75500,84 | 16 | | | |

*Valores tabelados de F a $p \leq 0,05$.

SQ = soma quadrática, GL = grau de liberdade, MQ = média quadrática