

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TESE

**Obtenção de um extrato concentrado a partir da
casca de uva cv. Alicante Bouschet (*Vitis vinifera* L.):
caracterização química, bioacessibilidade e aplicação
como corante**

Yineth Ruíz García

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

OBTENÇÃO DE UM EXTRATO CONCENTRADO A PARTIR DA
CASCA DE UVA CV. ALICANTE BOUSCHET (*VITIS VINIFERA* L.):
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, BIOACESSIBILIDADE E
APLICAÇÃO COMO CORANTE

YINETH RUÍZ GARCÍA

Sob a Orientação da Professora

D. Sc. Lourdes Maria Corrêa Cabral

e Co-orientação da Professora

D. Sc. Renata Valeriano Tonon

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Tecnologia de Alimentos.

Seropédica, RJ

Maio de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G216o García, Yineth Ruíz, 1986-
Obtenção de um extrato concentrado a partir da
casca de uva cv. Alicante Bouschet (*Vitis vinifera*
L.): caracterização química, bioacessibilidade e
aplicação como corante / Yineth Ruíz García. - Rio de
Janeiro, 2019.
106 f.: il.

Orientadora: Lourdes Maria Corrêa Cabral.
Coorientadora: Renata Valeriano Tonon.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, 2019.

1. extrato concentrado. 2. casca de uva. 3.
Alicante Bouschet. 4. bioacessibilidade. 5. corante.
I. Cabral, Lourdes Maria Corrêa, 1957-, orient. II.
Tonon, Renata Valeriano, 1980-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos. IV. Título.

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

YINETH RUÍZ GARCÍA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Tecnologia de Alimentos.

TESE APROVADA EM 10/05/2019



Renata Valeriano Tonon. D.Sc. Embrapa Agroindústria de Alimentos –
Presidente - (Coorientadora)



Lourdes Maria Corrêa Cabral. D.Sc. Embrapa Agroindústria de Alimentos
(Orientadora)



Suely Pereira Freitas. D.Sc.. EQ/UFRJ



Fabíola Helena dos Santos Fogaça. D.Sc. Embrapa Agroindústria de Alimentos



Mariana Teixeira da Costa Machado. D.Sc.. DTA/UFRRJ



Virgínia Martins da Matta. D.Sc.. Embrapa Agroindústria de Alimentos

DEDICATÓRIA

À minha família pelo incentivo e apoio.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Estudantes Convênio de Pós-graduação (PEC-PG) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Brasil pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) pela oportunidade;

À minha orientadora, a D. Sc. Lourdes Cabral, e a minha coorientadora, D. Sc. Renata Tonon, pela oportunidade de formar parte do grupo de pesquisa, pela orientação e confiança no meu trabalho durante estes 4 anos;

À minha outra coorientadora, a D. Sc. Carolina Beres, por me acolher como uma das suas primeiras alunas durante o seu Pós-doutorado, pelo apoio nas análises de laboratório, na revisão dos trabalhos, pelos conselhos e pela confiança;

Aos professores do PPGCTA, pela contribuição para minha formação, especialmente à D. Sc. Simone Matias, D. Sc. Maria Ivone Barbosa, D. Sc. José Lucena Barbosa Jr, e D. Sc. Elisa Rocha pelo apoio desde a minha chegada à UFRRJ;

À Embrapa Agroindústria de Alimentos-CTAA por ceder as instalações para a pesquisa e a todos os funcionários que me ajudaram, especialmente a Nilvanete (Nete) do CRA, às secretárias da Chefia: Cirlene, Kátia e Silvana, às funcionárias do SGP, principalmente a Camila que me recebeu e acompanhou de perto meu estágio na Embrapa;

À vinícola Rio Sol do grupo ViniBrasil por fornecer o bagaço de uva;

Aos técnicos das Plantas I e II, M. Sc Érika Fraga, M. Sc. Agnelli Oliveira, Sérgio Pontes, Luiz Fernando, William que me ajudaram e compartilharam seus conhecimentos e experiências nas análises de laboratório e nos processos tecnológicos. Também aos pesquisadores destas plantas, os doutores Leda Fortes, Karina dos Santos, Virgínia da Matta, Ana Carolina Chaves, Ângela Furtado, Renata Torrezan e Amauri Rosental;

Ao pesquisador D. Sc. Antônio Gómez e a sua equipe da Planta Piloto 5, especialmente, à analista D. Sc. Henriqueta Talita Barbosa por me ajudar com as minhas primeiras análises de determinação de antocianinas, pela amizade, confiança e força em todo momento. Também aos técnicos Caetano e Rodrigo Campos pela ajuda;

Ao professor D. Sc. Ronel Godoy e a sua equipe: D. Sc. Renata Borguini, D. Sc. Manuela Santiago, D. Sc. Sidney Pacheco, M. Sc. Monalisa Coelho, M. Sc. Luzimar Nascimento, D. Sc. Paola Ervatti e M. Sc. Marcelly Santos pelo apoio na CLAE e na CG;

À pesquisadora D. Sc. Sidinea de Freitas e a sua equipe pelo auxílio nas análises físico-químicas, e também ao analista Carmine Conte pela ajuda com as análises termogravimétricas;

À pesquisadora D. Sc. Janine Passos do Laboratório de Microbiologia pelo auxílio nos testes de atividade antimicrobiana e a sua equipe pelo apoio nas análises microbiológicas;

À pesquisadora D. Sc. Flávia Gómez e à analista M. Sc. Ana Paula de Oliveira pelo apoio nos testes de bioacessibilidade e por estar dispostas para ajudar;

À pesquisadora D. Sc. Rosemar Antoniassi e a sua equipe pela disposição e ajuda com a análise de ácidos graxos voláteis e processamento dos resultados;

À pesquisadora D. Sc. Ana Carolina Chaves pelo auxílio no planejamento da fase de aplicação do extrato, por estar sempre disposta a conversar e a colaborar com o meu trabalho;

À pesquisadora D. Sc. Daniela de Grandi do Laboratório de Análise Sensorial pelo planejamento e assistência no teste de avaliação sensorial. Também, ao técnico José Carlos Sá pela assistência nas análises de cor e à pós-doutoranda D. Sc. Marcela de Alcântara pela ajuda na realização e processamento dos dados do teste de avaliação sensorial.

Aos professores que participaram nas bancas de qualificação e da Tese: D. Sc. Maria Ivone Barbosa, D. Sc. Priscilla Finotelli (UFRJ), D. Sc. Suely Freitas (UFRJ), D. Sc. Ronel Godoy, D. Sc. Virgínia Martins (Embrapa), D. Sc. Fabíola Fogaça (Embrapa) e D. Sc. Mariana Teixeira (UFFRJ) pela revisão detalhada e recomendações valiosas.

À toda minha família, principalmente aos meus pais, Hilda e David, por me apoiaram e incentivaram sempre para chegar até aqui;

Ao meu esposo Jesús, meu porto seguro, pela confiança, compreensão, apoio e estímulo;

À minha família brasileira: dona Sandra, seu Nelinho e família em Nova Friburgo e a dona Márcia e seu Mauro em Campo Grande pelo apoio; também aos amigos cubanos Yeni, Joel, Amaury, Victor, Nely, Santiago pela ajuda e companhia;

Ao D. Sc Davy Hidalgo, amigo e parceiro de pesquisa pelo apoio no processamento estatístico dos dados da pesquisa e pelos bons conselhos de sempre;

Aos meus amigos de turma: Carol, Gabi, Verona, Víctor, Renata, Fabi, Dayana, Jamile, Walter, Davy, Laís, Rosiane, Amanda, Mayara, Andréa e Elaine, pela companhia e apoio.

As meninas do Alojamento da Pós, que me acolheram com muito carinho, especialmente minhas amigas Natalie, Ana Paula, Sheyla, Ayalla, Letícia, Nilce, Fabi e Nara, com vocês foi mais fácil a minha adaptação e mais felizes meus dias em Seropédica.

Aos estagiários da Embrapa e amigos que fiz durante o Doutorado, especialmente, a Gabi, Isadora, Manuela, Thaisi, Aline, Davy, Carolina Beres, Gessica, Nátili, Rosiane, Karen, Fabi, João, Gisele, Carol Coelho, Danielle, Laurine, Maraysa, Nara, Inayara, Larisa, Isabella, Leilson, Felipe. Muito especialmente agradeço às minhas queridas Gabi, Carol Martins, Natalie, Gessica e Aline por abrir as portas das suas casas quando precisei um lar, serei grata pela nossa amizade.

A todos que ajudaram de alguma forma, estarei eternamente agradecida.

RESUMO

GARCÍA, Yineth Ruíz. **Obtenção de um extrato concentrado a partir da casca de uva cv. Alicante Bouschet (*Vitis vinifera* L.): caracterização química, bioacessibilidade e aplicação como corante.** 2019. 106p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

A uva Alicante Bouschet (*Vitis vinifera* L.) é uma cultivar tintoreira com elevado teor de antocianinas na casca e na polpa, que tem sido usada para a produção de vinhos no semiárido do Brasil. Esta atividade gera muitos subprodutos ainda ricos em compostos fenólicos, principalmente antocianinas. O objetivo geral do presente trabalho foi a obtenção e caracterização de um extrato líquido concentrado a partir de casca de uva cv. Alicante Bouschet (*Vitis vinifera* L.) cultivada no semiárido do Brasil. Para isso, foram determinadas as condições da extração sólido-líquido mais adequadas para obter um extrato rico em compostos fenólicos com elevada capacidade antioxidante. O extrato líquido concentrado foi caracterizado quanto ao perfil de compostos fenólicos por CLAE-DAD, capacidade antioxidante pelos métodos ORAC e ABTS^{•+}, cor instrumental por reflectância e atividade antimicrobiana *in vitro* usando a técnica de difusão em poços. A estabilidade das antocianinas monoméricas e da cor do extrato foi avaliada durante a estocagem a baixas temperaturas. A bioacessibilidade dos compostos fenólicos foi avaliada mediante um modelo estático de digestão *in vitro*. A influência do extrato sobre a atividade metabólica e a modulação da microbiota intestinal humana foi estudada mediante um modelo estático de fermentação colônica *in vitro*. O extrato foi adicionado como corante em um preparado de frutas vermelhas adicionado a um sorvete. A estabilidade das antocianinas monoméricas e da cor destes produtos foram avaliadas após os processos de elaboração e durante a estocagem. Foi realizado um teste de aceitação sensorial dos sorvetes adicionados de preparado de frutas vermelhas com e sem adição do extrato líquido concentrado de casca de uva usando uma escala hedônica de 9 pontos. Os resultados indicaram que as condições mais adequadas para a extração foram: temperatura de 40 °C, concentração de etanol de 50% v/v e de ácido cítrico de 2% m/v. As antocianinas foram os compostos fenólicos majoritários no extrato, predominando a malvidina-3-*O*-(6-*O*-*p*-cumaroil)-glicosídeo e a malvidina-3-*O*-glicosídeo. A cor roxa avermelhada escura e opaca do extrato permaneceu estável sob congelamento a -18 °C até 45 dias de estocagem, porém pouco estável sob refrigeração a 5 °C (15 dias). O extrato de casca de uva inibiu o crescimento de todas as bactérias testadas, sendo mais efetivo contra *Staphylococcus aureus*. A bioacessibilidade de antocianinas monoméricas e flavanóis foi baixa (23% e 25%, respectivamente), após a digestão *in vitro*. Contudo, os ácidos fenólicos foram bioacessíveis (> 100%) após a digestão e após a fermentação colônica *in vitro*, resultando em uma elevada atividade antioxidante nestas fases. Apesar de que 24 horas de fermentação colônica *in vitro* não foram suficientes para estimular a multiplicação dos microrganismos da microbiota intestinal, a produção de ácidos graxos de cadeia curta sugere que o extrato de casca de uva favoreceu a atividade metabólica da microbiota e poderia ter um efeito prebiótico potencial na modulação da microbiota em longo prazo. O extrato líquido concentrado de casca de uva poderia ser usado como corante natural em preparados de frutas vermelhas para adição em sorvetes.

Palavras-chave: extrato concentrado, casca de uva, Alicante Bouschet, bioacessibilidade, corante

ABSTRACT

GARCÍA, Yineith Ruíz. **A concentrated extract obtained from the cv. Alicante Bouschet (*Vitis vinifera* L.): chemical characterization, bioaccessibility and application as dye.** 2019. 106p. Thesis (Ph.D. in Food Science and Technology). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

The Alicante Bouschet (*Vitis vinifera* L.) is a grape cultivar with high anthocyanin content in both pulp and skin, which has been used for the production of wines in the Brazilian semi-arid region. This activity generates many residues, still rich in phenolic compounds, mainly anthocyanins. The general objective of the present work was to obtain and characterize a concentrated liquid extract from cv. Alicante Bouschet (*Vitis vinifera* L.) cultivated in the semi-arid region of Brazil. To this, the most adequate solid-liquid extraction conditions were determined to obtain an extract rich in phenolic compounds with high antioxidant capacity. The concentrated liquid extract was characterized by the phenolic compounds profile by HPLC-DAD, antioxidant capacity by ABTS^{•+} and ORAC methods, instrumental color by reflectance and antimicrobial activity *in vitro* using the well diffusion test. The stability of the monomeric anthocyanins and extract color was evaluated during storage at low temperatures. The bioaccessibility of the phenolic compounds was evaluated using an *in vitro* digestion model. The influence of the extract on the metabolic activity and modulation of the human gut microbiota was studied using an *in vitro* colonic fermentation model. The extract was added as a dye in a red berries preparation that was added to an ice cream. The stability of the monomeric anthocyanins and of the color was evaluated after the elaboration processes and during the storage of these products. Sensory acceptance of ice creams added with red berries preparation with and without added liquid extract of grape skin was evaluated by using a 9-point hedonic scale. The conditions selected as the most adequate for the extraction were: temperature of 40 °C, 50% v/v ethanol and 2% m/v citric acid. Malvidin-3-*O*-(6-*O*-*p*-coumaroyl)-glucoside and malvidin-3-*O*-glucoside were the major anthocyanins. The purple-reddish dark and opaque color of the extract remained stable under freezing at -18 °C for up to 45 days of storage but was less stable under refrigeration at 5 °C (15 days). The grape skin extract inhibited the growth of all tested bacteria, being more effective against *Staphylococcus aureus*. The bioaccessibility of monomeric anthocyanins and flavanols was low (23% and 25%, respectively) after *in vitro* digestion. However, phenolic acids were highly bioaccessible (> 100%) after *in vitro* digestion and after colonic fermentation, resulting in high antioxidant activity in these phases. Although 24 h of *in vitro* colonic fermentation were not enough to stimulate the microbiota growth, the production of short chain fatty acids (SCFAs) in fermented extract indicate that the extract favored the metabolic activity of the intestinal microbiota. Therefore, the extract could have a potential prebiotic effect for the long-term modulation of the microbiota. The grape skin concentrated liquid extract could be used as a natural dye in red berries preparations and ice cream.

Keywords: concentrated extract, grape skin, Alicante Bouschet, bioaccessibility, dye

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1	Valores reais e codificados das variáveis independentes no delineamento composto central rotacional e resultados observados.....	13
Tabela 2	Coefficientes de regressão e análise do modelo para os teores de compostos fenólicos totais e de antocianinas monoméricas e para a capacidade antioxidante (ORAC e ABTS ^{•+}).....	14
Tabela 3	Coefficientes de correlação de Pearson entre o teor de compostos fenólicos totais, antocianinas monoméricas e a capacidade antioxidante (ORAC e ABTS ^{•+}).....	16

CAPÍTULO II

Tabela 1	Características físico-químicas, teor de compostos bioativos e atividade antioxidante do extrato líquido concentrado de casca de uva.....	30
Tabela 2	Teores de antocianinas monoméricas no extrato líquido concentrado de casca de uva.....	33
Tabela 3	Ácidos fenólicos e flavanóis identificados no extrato líquido concentrado de casca de uva.....	36
Tabela 4	Parâmetros de cor para o extrato líquido concentrado no tempo inicial e durante 60 dias de estocagem a -18 °C e 5°C.....	39
Tabela 5	Halos de inibição (diâmetro em mm) do crescimento bacteriano a diferentes concentrações (%) do extrato líquido concentrado de casca de uva.....	45

CAPÍTULO III

Tabela 1	Teores de compostos bioativos, bioacessibilidade e atividade antioxidante do extrato (bruto) de casca de uva cv. Alicante Bouschet, após as diferentes fases da digestão e após a fermentação colônica <i>in vitro</i>	58
Tabela 2	Teores de compostos fenólicos (mg/L extrato) no extrato (bruto) de casca de uva e nas amostras digeridas após as diferentes fases da digestão e após a fermentação colônica <i>in vitro</i>	61
Tabela 3	Contagem em placas das colônias dos microrganismos representativos da microbiota intestinal no tempo inicial (t = 0 h) e após 24 h da fermentação <i>in vitro</i> do extrato de casca de uva e do controle (amostra sem extrato de uva).....	66
Tabela 4	Ácidos graxos voláteis de cadeia curta (AGVCC) após 24 h da fermentação colônica <i>in vitro</i>	67

CAPÍTULO IV

Tabela 1	Composição centesimal e características físico-químicas do preparado de frutas vermelhas (morango e amora) adicionado de extrato de casca de uva e do sorvete adicionado deste preparado.....	78
Tabela 2	Teores das antocianinas majoritárias no preparado de frutas vermelhas (morango e amora) com extrato de casca de uva antes e após o processo de esterilização.....	80
Tabela 3	Parâmetros de cor do preparado de frutas vermelhas com extrato de casca de uva e do sorvete adicionado deste preparado antes da esterilização e durante 60 dias de estocagem.....	83
Tabela 4	Características sensoriais dos sorvetes adicionados de preparado de frutas vermelhas com e sem extrato de casca de uva.....	86

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1** Gráficos de superfície de resposta que representam a influência do processo de extração sobre o teor de compostos fenólicos totais (CFT) (a-c), teor de antocianinas monoméricas (AM) (d) e na capacidade antioxidante medida pelos métodos ORAC (e) e ABTS^{•+} (f)..... 14
- Figura 2** Perfis para os valores preditos das desejabilidades individuais e global na otimização da extração..... 18

CAPÍTULO II

- Figura 1** Cromatograma a 520 nm mostrando as antocianinas detectadas no extrato líquido concentrado de casca de uva. (1) delphinidina-3-*O*-glicosídeo, (2) cianidina-3-*O*-glicosídeo, (3) petunidina-3-*O*-glicosídeo, (4) peonidina-3-*O*-glicosídeo, (5) malvidina-3-*O*-glicosídeo, (6-22) Não identificadas, (23) peonidina-3-*O*-(6-*O*-*p*-coumaril)-glicosídeo, (24) malvidina-3-*O*-(6-*O*-*p*-coumaril)-glicosídeo, (25-27) Não identificadas..... 32
- Figura 2** Cromatograma da fração de ácidos fenólicos e flavanóis do extrato líquido concentrado de casca de uva, em 270 nm. (1) ácido gálico, (2) ácido protocatecuico, (3) (+)catequina, (4) ácido vanílico, (5) ácido siríngico, (6) (-)epicatequina..... 35
- Figura 3** Cromatograma da fração de ácidos fenólicos e flavanóis do extrato líquido concentrado de casca de uva, em 370 nm. (1) ácido elágico..... 35
- Figura 4** Curva termogravimétrica (TG) (linha pontuada) e curva termogravimétrica da primeira derivada (DTG) do extrato líquido concentrado de casca de uva..... 37
- Figura 5** (a) Extrato líquido concentrado no tempo inicial do estudo de estabilidade. (b) Espaço de cor CIELab (modificado de www.linocolor.com). (c) Distribuição da cor do extrato durante a estocagem baseada nas coordenadas CIELab: (●) Refrigeração/roxo escuro, (○) Refrigeração/vermelho escuro, (▲) Congelamento/roxo escuro, (△) Congelamento/vermelho escuro..... 40
- Figura 6** Cinética de degradação das antocianinas monoméricas no extrato de casca de uva a pH 2,91 durante a estocagem a -18 °C (◆) e 5 °C (■). C₀ e C: concentrações de antocianinas monoméricas inicial e em cada tempo avaliado, respectivamente..... 43

CAPÍTULO III

- Figura 1** Correlograma entre os compostos bioativos e a atividade antioxidante. Correlações significativas ($p < 0,05$): positivas (azul) e negativas (vermelho) de acordo com o teste de correlação linear de Pearson..... 63
- Figura 2** Análise de Componentes Principais (ACP): (a) em função das variáveis de resposta (análises de compostos bioativos e atividade antioxidante), (b) em função dos tratamentos (fases da digestão e fermentação colônica *in vitro*) e (c) Agrupamento Hierárquico dos Componentes Principais (AHCP)..... 64

CAPÍTULO IV

- Figura 1** Apresentação das amostras de sorvete para os consumidores no teste de aceitação..... 76
- Figura 2** Ficha de avaliação utilizada no teste de aceitação dos sorvetes..... 77
- Figura 3** Teores das antocianinas majoritárias no preparado de frutas vermelhas (morango e amora) com extrato de casca de uva durante a estocagem a 25 °C. Cy3gl: cianidina-3-glicosídeo, Cy3rut: cianidina-3-rutinosídeo, Pg3gl: pelargonidina-3-glicosídeo, Pg3rut: pelargonidina-3-rutinosídeo, Pn3gl: peonidina-3-glicosídeo, Mv3gl: malvidina-3-glicosídeo, Cy-3-dioxalilgl: cianidina-3-dioxalil-glicosídeo, Pn-3-6cmgl: peonidina-3-(6-*p*-cumaril)-glicosídeo, Mv-3-6cmgl: malvidina-3-(6-*p*-cumaril)-glicosídeo. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) nos teores das antocianinas entre os tempos de estocagem..... 81
- Figura 4** Teores das antocianinas majoritárias no sorvete adicionado de preparado de frutas vermelhas (morango e amora) com extrato de casca de uva durante a estocagem. Cy3gl: cianidina-3-glicosídeo, Cy3rut: cianidina-3-rutinosídeo, Pg3gl: pelargonidina-3-glicosídeo, Pg3rut: pelargonidina-3-rutinosídeo, Pn3gl: peonidina-3-glicosídeo, Mv3gl: malvidina-3-glicosídeo, Cy-3-dioxalilgl: cianidina-3-dioxalil-glicosídeo, Pn-3-6cmgl: peonidina-3-(6-*p*-cumaril)-glicosídeo, Mv-3-6cmgl: malvidina-3-(6-*p*-cumaril)-glicosídeo. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) nos teores das antocianinas entre os tempos de estocagem..... 82
- Figura 5** Preparado de frutas vermelhas com extrato de casca de uva antes (a) e após (b) o processo de esterilização..... 84
- Figura 6** Sorvete adicionado de preparado de frutas vermelhas sem extrato de casca de uva (a) e com (b) extrato de casca de uva..... 85
- Figura 7** Porcentagem (% em relação ao total de respostas) de escolha de cada fruta para descrever o sabor dos sorvetes. SPF (sorvete adicionado de preparado de frutas vermelhas). SPFE (sorvete adicionado de preparado de frutas vermelhas com extrato de casca de uva)..... 87

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

a^*	coordenada de cor ($+a^*$ = vermelho e $-a^*$ = verde);
AAPH	dicloridrato de 2,2,Azobis(2-metilpropionamida);
ABTS ^{•+}	atividade sequestradora do radical catiônico;
ACP	Análise de Componentes Principais;
AGV	cidos graxos voláteis;
AGVCC	cidos graxos voláteis de cadeia curta;
AHCP	Agrupamento Hierárquico dos Componentes Principais;
AM	antocianinas monoméricas;
AT	acidez total;
b^*	coordenada de cor ($+b^*$ = amarelo e $-b^*$ = azul);
BHI	<i>Brain and Heart Infusion</i> ;
BIM-25	Bifidobacterium iodoacetate medium 25;
C_{ab}^*	croma ou saturaco da cor;
CFT	compostos fenólicos totais;
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos;
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas;
Cy-3-dioxalilgl	cianidina-3-dioxalil-glicosídeo;
Cy3gl	cianidina-3-glicosídeo;
Cy3rut	cianidina-3-rutinosídeo;
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional;
DP	desvio padrão;
DTG	curva termogravimétrica da primeira derivada;
EAG	equivalente ao ácido gálico;
ET	equivalente ao Trolox;
F	teste de Fischer;
F_0	letalidade do processo de esterilizaco;
FFAP	<i>Free Fatty Acids Phase</i> ;
GRAS	geralmente reconhecido como seguro;
h_{ab}	ângulo de tom;

HCl	ácido clorídrico;
k	velocidade de degradação;
L^*	luminosidade;
MRS	água De Man, Rogosa e Sharp;
MSR	Metodologia de Superfície Resposta;
Mv-3-6cmgl	malvidina-3-(6- <i>p</i> -cumaril)-glicosídeo;
Mv3gl	malvidina-3-glicosídeo; malvidina-3- <i>O</i> -glicosídeo;
NH ₄ ⁺	íon amônio;
ORAC	capacidade de absorção do radical oxigênio;
<i>overrun</i>	incorporação do ar no sorvete;
p	probabilidade de significância;
PFE	preparado de frutas vermelhas com extrato de casca de uva;
Pg3gl	pelargonidina-3-glicosídeo;
Pg3rut	pelargonidina-3-rutinosídeo;
Pn-3-6cmgl	peonidina-3-(6- <i>p</i> -cumaril)-glicosídeo;
Pn3gl	peonidina-3-glicosídeo;
r	coeficiente de correlação de Pearson;
R ²	coeficiente de determinação;
RCA	<i>Reinforeced Clostridial Agar</i> ;
SPFE	sorvete com preparado de frutas vermelhas e extrato de casca de uva;
SST	sólidos solúveis totais;
t	teste t de Student;
$t_{1/2}$	tempo de meia-vida;
TG	curva termogravimétrica;
Trolox	6-hidroxi-2-5-7-8-tetrametilcromo 2-carboxílico;
UFC	unidade formadora de colônia;
US-FDA	<i>US Food and Drug Administration</i> ;
ΔE^*	diferença total da cor.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I. Influência das condições de processo sobre a extração de compostos bioativos da casca de uva Alicante Bouschet (<i>Vitis vinifera</i> L.).....	5
1. Introdução.....	8
2. Material e Métodos.....	9
3. Resultados e Discussão.....	11
CAPÍTULO II. Caracterização, estabilidade e atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> de um extrato líquido concentrado obtido da casca de uva cv. Alicante Bouschet (<i>Vitis vinifera</i> L.).....	19
1. Introdução.....	22
2. Material e Métodos.....	24
3. Resultados e Discussão.....	29
CAPÍTULO III. Digestão <i>in vitro</i> de um extrato líquido concentrado de casca de uva cv. Alicante Bouschet (<i>Vitis vinifera</i> L.): Bioacessibilidade dos compostos fenólicos e efeito na microbiota intestinal humana.....	47
1. Introdução.....	50
2. Material e Métodos.....	51
3. Resultados e Discussão.....	57
CAPÍTULO IV. Estudo de estabilidade das antocianinas e da cor durante a estocagem de um preparado de frutas vermelhas com extrato concentrado de casca de uva e de um sorvete adicionado deste preparado.....	69
1. Introdução.....	72
2. Material e Métodos.....	73
3. Resultados e Discussão.....	77
CONCLUSÕES GERAIS	89
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

INTRODUÇÃO GERAL

A uva é uma das frutas mais importantes em nível mundial sendo utilizada tanto para consumo *in natura* quanto como matéria-prima para a elaboração de produtos como suco, geléia, passas e vinhos (Dhekney, 2016). Estima-se que cerca de 80% da produção de uvas do mundo seja destinada à produção de vinhos. A viticultura é uma das principais atividades econômicas no mundo. A produção mundial de uvas alcançou 7,58 milhões de toneladas em 2016, sendo 18% correspondentes a países do continente americano (OIV, 2017). Embora o Brasil não esteja entre os maiores produtores de uvas, sucos e vinhos, a vitivinicultura é uma atividade que está presente em vários estados. A região do Vale do Submédio do São Francisco, localizada no Nordeste do Brasil, destaca-se como a segunda maior produtora de vinhos no país (Lucena *et al.*, 2010), sendo pioneira na produção de vinhos finos de qualidade em regiões tropicais do mundo (Protas e Camargo, 2011).

A vitivinicultura do semiárido brasileiro é uma excepcionalidade, uma vez que está localizada entre os paralelos 8° e 9° do Hemisfério Sul, a mais próxima do Equador entre todas as regiões vitícolas do mundo. Apresenta condições edafoclimáticas bem peculiares como elevada intensidade das radiações solares (3000 horas/ano), temperatura média anual de 26 °C, baixa pluviosidade (aproximada de 500 mm), 350 m de altitude e solo pedregoso às margens do rio São Francisco (Soares e Leão, 2009; Lucena *et al.*, 2010). Essas características, aliadas com a adequada tecnologia de irrigação, permitem o escalonamento da produção, com videiras produzindo uvas o ano todo e a colheita de duas ou mais safras por ano (Coimbra De Sá *et al.*, 2015; Padilha *et al.*, 2016). Atualmente, a região conta com cerca de 400 hectares de vinhedos, produzindo uvas para elaborar aproximadamente 4 milhões de litros de vinhos finos tranquilos e espumantes por ano (Coelho *et al.*, 2018).

Nesse cenário, de expansão e crescimento da indústria do vinho, é gerada uma grande quantidade de resíduos. O bagaço abrange cascas, polpa remanescente e sementes e constitui um dos principais subprodutos e equivale a 20% do peso da uva processada (Dilas *et al.*, 2009; De Mello e Da Silva, 2014). Na produção de 6 litros de vinho se gera 1 kg de bagaço como principal subproduto da vinificação (Mendes *et al.*, 2013), cujo descarte implica em custos econômicos e problemas ambientais para a vinícola geradora (De Mello e Da Silva, 2014).

A própria composição química faz do bagaço de uva um contaminante ambiental. Porém, este pode ser fonte de substâncias bioativas a ser reutilizada pela indústria. Vários estudos têm confirmado que o bagaço de uva apresenta um alto teor de compostos fenólicos que permanecem nas cascas e sementes em razão da sua incompleta extração durante o processo de vinificação (Rockenbach *et al.*, 2011; Brazinha *et al.*, 2014; Kammerer *et al.*, 2014; Ky *et al.*, 2014; Drosou *et al.*, 2015; Trikas *et al.*, 2016; Caldas *et al.*, 2018; Favre *et al.*, 2019). Segundo Kammerer *et al.* (2004), apesar da grande variabilidade entre as diferentes cultivares de uvas quanto aos compostos fenólicos individuais, tanto as cascas como as sementes constituem uma fonte promissora desses bioativos.

As cascas das uvas vermelhas apresentam elevados teores de antocianinas após a prensagem, além de outros compostos fenólicos como ácidos hidroxinâmicos e flavanóis. Estes compostos são responsáveis pelas características sensoriais do vinho como a cor e a adstringência e por isso é de grande importância conhecer a influência de cada *terroir* nas diferentes variedades de uvas (Costa *et al.*, 2015).

A Alicante Bouschet (*Vitis vinifera* L.), também conhecida como Garnacha Tintorera, é um híbrido desenvolvido por Henri Bouschet, na França, a partir do cruzamento entre a Petit

Bouschet e a Grenache. Esta cultivar é uma das poucas cultivares *Vitis vinifera* onde tanto a casca quanto a polpa são da cor vermelha, chamada de tintureira. A Alicante Bouschet é muito usada em cortes desde a sua criação com o objetivo de incrementar a intensidade da cor dos vinhos produzidos a partir das variedades já reconhecidas (Castillo-Muñoz *et al.*, 2009; Dardeau, 2015). Esta cultivar encontra-se entre as melhores adaptadas ao clima semiárido e está presente em rótulos com reconhecimento nacional e internacional (Dardeau, 2015).

No Brasil, juntam-se as características genéticas da uva Alicante Bouschet, reconhecida pela intensa cor dos frutos, derivada do elevado teor de antocianinas tanto na casca quanto na polpa (Castillo-Muñoz *et al.*, 2009; Figueiredo-González *et al.*, 2013), com as condições de estresse do clima semiárido do Vale do Submédio do São Francisco onde a videira tem sido cultivada como, por exemplo, sob intensa radiação UV, o que resulta em uma maior concentração destes metabólitos secundários gerados pela planta. A avaliação do potencial da cultivar Alicante Bouschet cultivada no semiárido brasileiro é de grande interesse para indústria, assim como os processos que permitam recuperar esses compostos na forma de extratos naturais. A extração de compostos fenólicos e antocianinas a partir dos subprodutos da vinificação constitui uma alternativa favorável ao meio ambiente e rentável, pois agrega valor a um recurso natural de baixo custo.

A extração constitui a primeira etapa para o isolamento e purificação dos compostos bioativos a partir das frações das plantas (Ćujić *et al.*, 2016). A extração sólido-líquido é um método convencional, que não requer grande investimento nem equipamento sofisticado e que poderia ser implementado em escala industrial na mesma vinícola ou destilaria onde são gerados os resíduos. A aplicação de solventes biocompatíveis e considerados seguros como água e etanol possibilita a obtenção de extratos “naturais” com alto valor agregado. Também, o uso dos extratos na forma líquida em alimentos, apenas com uma etapa de concentração para evaporação do etanol, oferece vantagens quanto à dosagem e ao baixo custo de produção (Amendola *et al.*, 2010).

Posteriormente, a caracterização do extrato líquido concentrado é de grande importância para a sua aplicação como ingrediente em alimentos. O elevado teor de compostos fenólicos, dentre eles as antocianinas, predomina entre as características dos extratos obtidos a partir dos resíduos da vinificação da cv. Alicante Bouschet. Esses pigmentos conferem intensa cor vermelho-violeta aos extratos, pelo que podem ser adicionados como corantes naturais em substituição aos corantes sintéticos geralmente usados para conferir tons de vermelho aos alimentos. Diversas pesquisas têm relatado que os corantes sintéticos produzem efeitos tóxicos como alergias de vários tipos e hiperatividade em crianças (Aberoumand, 2011; Chapman, 2011; Feketea e Tsabouri, 2017).

O uso das antocianinas oferece diferentes vantagens: são substâncias inócuas e solúveis em água, o que facilita a sua incorporação em meio aquoso e os converte numa opção interessante como corantes naturais hidrossolúveis (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009; Markakis, 2012). Porém, as antocianinas podem se tornar instáveis quando extraídas da matriz vegetal (Giusti e Wrolstad, 2003) o que limita o uso destes pigmentos em alimentos. Diversos fatores intrínsecos podem afetar a estabilidade das antocianinas: estrutura química, concentração, padrões de glicosilação e acilação da molécula. Também fatores extrínsecos como pH, temperatura, luz, oxigênio, solventes, dentre outros, a que são submetidos os alimentos durante o processamento e a estocagem (Giusti e Wrolstad, 2003; Castaneda-Ovando *et al.*, 2009{Giusti, 2003 #153).

Devido ao fato das perdas de cor nos alimentos estarem relacionadas com a degradação das antocianinas, muitos autores estudam as mudanças da cor e a cinética de degradação das antocianinas para monitorar a qualidade dos alimentos após o processamento e estimar a vida

útil dos alimentos durante a estocagem (Kirca *et al.*, 2006; Wang e Xu, 2007; Pathare *et al.*, 2013; Hernández-Herrero e Frutos, 2014; Wang *et al.*, 2015; You *et al.*, 2018).

Além do potencial corante, diversos estudos têm relacionado os compostos fenólicos, particularmente as antocianinas, com efeitos benéficos para a saúde, como atividades antioxidante (Smeriglio *et al.*, 2016), anticancerígena (Chen *et al.*, 2018), antiinflamatória e neuroprotetora (Li *et al.*, 2017). Em particular, vários extratos obtidos a partir de resíduos da produção do vinho têm sido associados a atividades neuroprotetora (Granzotto e Zatta, 2014; Wu *et al.*, 2018), antiinflamatória e contra o estresse oxidativo (Hogan *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2017) e atividades antibacterianas e antifúngicas (Katalinić *et al.*, 2010; Sagdic *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013). A avaliação destas propriedades nos extratos de bagaço de uva também permite selecionar as possíveis aplicações na indústria. Extratos com atividade antimicrobiana poderiam ser usados como conservantes naturais em formulações de alimentos inibindo o crescimento dos microrganismos responsáveis por sua deterioração e/ou de bactérias patogênicas que causam doenças transmitidas por alimentos.

Diante do potencial para a saúde desses compostos, estudos recentes têm avaliado seu comportamento durante e após a digestão. Contrariamente ao que se pensava no passado, pesquisas recentes têm revelado que os metabólitos formados após a ingestão de alimentos durante a passagem pelo trato gastrointestinal e após a fermentação colônica são os responsáveis pelas bioatividades dos compostos fenólicos, e não os compostos fenólicos presentes na matriz original (Piwowarski *et al.*, 2014; Mosele *et al.*, 2015; Ozdal *et al.*, 2016; Cueva *et al.*, 2017). A microbiota intestinal é modulada à medida em que os polifenóis são metabolizados pelas bactérias do intestino. Os metabólitos resultantes do metabolismo microbiano são melhor absorvidos que seus precursores e poderiam ser os principais responsáveis pelos efeitos benéficos no sistema digestivo e, uma vez absorvidos, nos diferentes tecidos e órgãos (Cueva *et al.*, 2017).

Os estudos baseados em modelos *in vitro* que simulam os processos de digestão (oral, gástrica, intestinal) e de fermentação colônica permitem avaliar a estabilidade dos compostos fenólicos durante a passagem pelo trato gastrointestinal e estimar quais desses compostos serão bioacessíveis aos microrganismos que habitam o colón. Por sua vez, os modelos de fermentação colônica *in vitro* contribuem para avaliar a influência dos compostos fenólicos na microbiota do intestino. Após as fermentações *in vitro*, tem sido observada uma diminuição dos compostos fenólicos e um incremento no crescimento das bactérias benéficas que podem ser consideradas evidências de que os compostos fenólicos constituem fontes de carbono e energia (Mosele *et al.*, 2015). A quantificação de metabólitos como ácidos graxos de cadeia curta e íons amônio, conjuntamente com o aumento ou a diminuição no crescimento de determinados microrganismos, também são indicadores da atividade metabólica e da modulação da microbiota intestinal. O sinergismo observado entre os diferentes microrganismos que compõem a microbiota favorece a homeostase intestinal e a saúde do hospedeiro (Mosele *et al.*, 2015; Ozdal *et al.*, 2016).

A justificativa para o estudo dos subprodutos da vinificação da cultivar Alicante Bouschet na região do Vale do Submédio do São Francisco se sustenta no fato desta ser uma variedade originária do clima temperado submetida a condições edafoclimáticas do clima semiárido, completamente diferentes às da viticultura tradicional, e combinadas com as técnicas de irrigação que potencializam o acúmulo de metabólitos secundários nas uvas, principalmente antocianinas. Os subprodutos da vinificação da cv. Alicante Bouschet são muito abundantes no Vale do Submédio do São Francisco, pois a produção de vinhos tropicais nessa região, a segunda maior produtora do Brasil, baseia-se principalmente nesta cultivar (Camargo *et al.*,

2010; Padilha *et al.*, 2016). O aproveitamento dos resíduos agroindustriais e sua aplicação tecnológica pode gerar produtos de alto valor agregado.

Neste contexto, o objetivo geral do presente trabalho foi a obtenção e caracterização de um extrato líquido concentrado a partir de cascas de uvas, resíduos da vinificação em tinto de uvas da cultivar Alicante Bouschet (*Vitis vinifera* L.).

Para atingir o objetivo geral, foram considerados os seguintes objetivos específicos:

- Determinar as melhores condições da extração sólido-líquido para obter um extrato rico em compostos fenólicos com elevada capacidade antioxidante;
- Caracterizar o extrato líquido concentrado quanto às suas características físico-químicas, perfil de compostos fenólicos, capacidade antioxidante, cor instrumental e atividade antimicrobiana *in vitro*;
- Avaliar a estabilidade da cor e das antocianinas monoméricas presentes no extrato líquido concentrado, durante a estocagem em baixas temperaturas;
- Avaliar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos e a atividade antioxidante após a digestão e a fermentação colônica *in vitro* do extrato;
- Estudar a influência do extrato na modulação e na atividade metabólica da microbiota intestinal;
- Avaliar o uso do extrato como corante natural em preparado de frutas vermelhas e sorvetes.

Estrutura da tese

Este trabalho de tese está organizado em quatro capítulos. Cada um deles foi dividido em três seções: **Introdução**, **Material e Métodos** e **Resultados e Discussão**. Ao começo de cada capítulo são apresentados o **Resumo** e o **Abstract** do mesmo. Ademais, a tese conta com uma **Introdução Geral** e **Conclusões Gerais**. Todas as **Referências Bibliográficas** utilizadas aparecem listadas ao final do documento.

No **Capítulo I** é apresentado o estudo da influência das condições de processo sobre a extração de compostos bioativos da casca de uva Alicante Bouschet (*Vitis vinifera* L.). Os principais resultados deste capítulo foram publicados na revista *Journal of Food Science and Technology* (<https://doi.org/10.1007/s13197-018-3535-x>), e apresentados no congresso *1st ICBC and 2nd International Workshop on Bioactive Compounds: Food Design and Health Nutrition*, 2018.

A caracterização química, estabilidade e atividade antimicrobiana de um extrato líquido concentrado obtido da casca de uva do cultivar estudado nesta tese está descrita no **Capítulo II**. Os resultados preliminares deste capítulo foram apresentados no congresso *33rd EFFoST International Conference: Sustainable Food Systems*, 2018.

No **Capítulo III** tem-se o estudo da digestão *in vitro* do extrato líquido concentrado de casca de uva: bioacessibilidade dos compostos fenólicos e efeito na microbiota intestinal humana.

Finalmente, foi estudada a estabilidade da cor e das antocianinas durante a estocagem de um preparado de frutas vermelhas com extrato concentrado de casca de uva e de um sorvete adicionado deste preparado, que é apresentada no **Capítulo IV**.

CAPÍTULO I

INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE PROCESSO SOBRE A EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA CASCA DE UVA ALICANTE BOUSCHET (*VITIS VINIFERA L.*)

RESUMO

Alicante Bouschet é uma variedade de uva tinta muito rica em antocianinas tanto na casca quanto na polpa, a qual tem sido cultivada na região semiárida do Brasil, gerando uma grande quantidade de resíduos ricos em compostos bioativos. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos das condições de processo sobre a extração sólido-líquido dos compostos bioativos a partir da casca de uva cv. Alicante Bouschet cultivada no clima semiárido do Brasil. Foi avaliada a influência das variáveis de processo: temperatura (23–57 °C), concentração de etanol (16–84%) e concentração de ácido cítrico (0–4%) sobre o teor de compostos fenólicos totais, antocianinas monoméricas e capacidade antioxidante dos extratos (métodos ABTS^{•+} e ORAC). Os resultados mostraram que a concentração de etanol e a temperatura tiveram influência significativa na extração dos compostos fenólicos totais e na capacidade antioxidante. A extração das antocianinas monoméricas somente foi afetada pela concentração de etanol. A adição de ácido cítrico à solução extratora não influenciou na extração das antocianinas monoméricas e na capacidade antioxidante dos extratos. Contudo, foi observado um leve incremento no teor de compostos fenólicos totais quando foram usadas concentrações maiores de ácido cítrico. As condições selecionadas como as mais adequadas para a extração foram: temperatura de 40 °C, concentração de etanol de 50% v/v e de ácido cítrico de 2% m/v. O teor de compostos fenólicos apresentou uma forte correlação positiva e significativa ($p < 0,05$) ($r = 0,906$) com a capacidade antioxidante medida pelo método ABTS^{•+}. Por outro lado, a capacidade antioxidante medida pelo método ORAC apresentou uma correlação positiva e significativa ($r = 0,851$) ($p < 0,05$) com o teor de antocianinas monoméricas. Ambos os métodos de avaliação da capacidade antioxidante se correlacionaram de forma positiva e significativa ($p < 0,05$) ($r = 0,847$).

Palavras-chave: extração sólido-líquido, compostos bioativos, capacidade antioxidante, casca de uva, Alicante Bouschet

ABSTRACT

Alicante Bouschet is a red grape variety very rich in anthocyanins in both skin and pulp, which have been cultivated in the vineyards of the semi-arid region of Brazil, generating a large amount of residues rich in bioactive compounds. The aim of this study was to evaluate the effects of process conditions on the solid-liquid extraction of bioactive compounds from the Alicante Bouschet grape skin. The influence of temperature (23–57 °C), ethanol concentration (16–84%) and citric acid concentration (0.8–4%) on the content of total phenolic compounds, monomeric anthocyanins and on the antioxidant capacity (ABTS^{•+} and ORAC methods) of the extracts was investigated. Ethanol concentration and temperature had a significant influence on total phenolic compounds extraction and antioxidant capacity while monomeric anthocyanin extraction was only affected by ethanol concentration. The addition of citric acid caused a slight increase in the total phenolic content. The conditions selected as the most adequate for the extraction were: temperature of 40 °C, 50% v/v ethanol and 2% m/v citric acid. Total phenolic content presented a strong significant positive correlation ($p < 0.05$) ($r = 0.906$) with the antioxidant capacity measured by the ABTS^{•+} method. On the other hand, the antioxidant capacity measured by the ORAC method presented a significant positive correlation ($r = 0.851$) ($p < 0.05$) with monomeric anthocyanin content. Both methods of antioxidant capacity assessment were positively and significantly correlated ($p < 0.05$) ($r = 0.847$) one to the other.

Keywords: solid-liquid extraction, bioactive compounds, antioxidant capacity, grape skin, Alicante Bouschet

1 INTRODUÇÃO

A região do Vale do Submédio de São Francisco (VSF), localizada no nordeste do Brasil, constitui uma excepcionalidade na vitivinicultura mundial, com condições edafoclimáticas totalmente diferentes das regiões tradicionais de clima temperado. O VSF se caracteriza pelo clima semiárido, com temperatura média anual de 26 °C, elevada intensidade da radiação solar (3000 horas/ano) e baixa pluviosidade (500 mm/ano). Essa região tem o diferencial de utilizar tecnologias de irrigação, que permitem realizar duas safras por ano (Coelho *et al.*, 2018) e produzir vinhos o ano todo. Assim, a região destaca-se como a segunda maior produtora de vinhos do país, sendo pioneira na produção de vinhos finos de qualidade em regiões tropicais do mundo (Lucena *et al.*, 2010). Atualmente, a região produz 4 milhões de litros de vinhos por ano, principalmente espumantes e tintos (Pereira *et al.*, 2016).

A uva da variedade Alicante Bouschet (*Vitis vinifera* L.), também conhecida como Garnacha Tintorera, é um híbrido desenvolvido na França, a partir do cruzamento entre as variedades Petit Bouschet e Grenache. Esta é uma das poucas cultivares *Vitis vinifera* onde tanto a casca quanto a polpa das uvas são da cor vermelha. A casta Alicante Bouschet é muito usada para incrementar a intensidade da cor dos vinhos produzidos a partir das variedades já reconhecidas na produção de vinhos tintos de qualidade (Castillo-Muñoz *et al.*, 2009; Dardeau, 2015). Esta cultivar encontra-se entre as melhores adaptadas ao clima semiárido e está presente em rótulos com reconhecimento nacional e internacional (Dardeau, 2015). No Brasil, as características genéticas da uva Alicante Bouschet, como o elevado teor de antocianinas tanto na casca quanto na polpa (Castillo-Muñoz *et al.*, 2009; Figueiredo-González *et al.*, 2014), juntamente com as condições de estresse do clima semiárido nordestino onde essa videira tem sido cultivada, como por exemplo a intensa radiação UV, resulta em uma maior concentração destes metabólitos secundários nas uvas.

A produção do vinho implica na geração de uma grande quantidade de subprodutos, com destaque para o bagaço de uva, cuja eliminação pode constituir um problema para a indústria (Mendes *et al.*, 2013). A composição química que torna o bagaço de uva um contaminante ambiental, também o converte em uma fonte de substâncias bioativas. Vários estudos têm confirmado que o bagaço de uva apresenta um alto teor de compostos fenólicos que permanecem nas cascas e sementes em razão da sua incompleta extração durante o processo de vinificação (Rockenbach, Rodrigues, *et al.*, 2011; Brazinha *et al.*, 2014; Kammerer *et al.*, 2014; Caldas *et al.*, 2018). Em particular, as cascas das uvas tintas apresentam elevados teores de antocianinas e outros compostos fenólicos (Castillo-Muñoz *et al.*, 2009; Figueiredo-González *et al.*, 2014), avaliados como potenciais antioxidantes (Kumar *et al.*, 2015) e corantes em alimentos (Giusti e Wrolstad, 2003). Dessa forma, a extração destes compostos representa uma alternativa de aproveitamento dos subprodutos da indústria vinícola, resultando em ingredientes de baixo custo e com alto valor agregado.

A extração sólido-líquido é um método convencional amplamente usado na extração a partir de materiais vegetais, que não requer equipamento sofisticado e, portanto, poderia ser implementado em escala industrial na mesma vinícola ou destilaria onde se geram os subprodutos. Vários fatores têm sido avaliados na extração sólido-líquido a partir de fontes naturais como a razão soluto/solvente, o tipo e concentração do solvente, temperatura e tempo (Cacace J. E. e Mazza, G., 2003; Pinelo *et al.*, 2005; Spigno *et al.*, 2007; Boonchu e Utama-Ang, 2015). Também são importantes aspectos como a acidificação dos solventes, a variedade de uva e a parte do vegetal avaliada (Pinelo *et al.*, 2005; Fontana *et al.*, 2013). As misturas de etanol/água têm sido reportadas como eficientes na extração de compostos fenólicos a partir do bagaço de uvas (Brazinha *et al.*, 2014; Boonchu e Utama-Ang, 2015). Esses solventes são

biocompatíveis e considerados como GRAS (geralmente reconhecidos como seguros pela US-FDA) o que incrementa as possibilidades de aplicação dos extratos em alimentos (Brazinha *et al.*, 2014).

Os trabalhos existentes na literatura focam a atenção no estudo da composição fenólica da uva Alicante Bouschet cultivada em regiões de clima temperado tradicionais na produção de uvas e vinhos (Castillo-Muñoz *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2015; Revilla *et al.*, 2016). Embora diversos trabalhos tenham avaliado a extração de compostos fenólicos a partir de bagaço de uva de diferentes variedades, só um deles avaliou a extração desses compostos a partir do bagaço da variedade Alicante Bouschet também cultivada em clima temperado (Pinelo *et al.*, 2005). Contudo, ainda não foram publicados estudos sobre a extração de compostos fenólicos a partir de subprodutos desta variedade cultivada nas condições do clima semiárido do nordeste do Brasil, apesar da importância de se determinar a influência do clima regional no teor de compostos fenólicos dos subprodutos e uma possível aplicação tecnológica. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos das variáveis de processo (temperatura, concentração de etanol e concentração de ácido cítrico) na extração sólido-líquido da casca de uva Alicante Bouschet e selecionar as melhores condições de extração mediante a metodologia de superfície de resposta, visando obter os maiores teores de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas e a máxima capacidade antioxidante nos extratos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria prima

O bagaço fresco (cascas, polpa residual e sementes) de uva da variedade Alicante Bouschet, proveniente da produção de vinho tinto, foi fornecido pela vinícola Rio Sol, do grupo ViniBrasil (Lagoa Grande, PE, Brasil). O bagaço foi seco em secador convectivo de bandejas, a 60 °C por 24 horas. O material seco foi processado em uma despulpadeira Bonina 0.25 df (Itametal, Itabuna, Brasil) para separar as sementes da casca. A casca foi moída em um moinho de discos (Perten Instruments AB, Huddinge, Suécia), obtendo-se a farinha da casca de uva.

2.2 Processo de extração

A farinha da casca de uva foi submetida à extração convencional em banho termostático (Marconi - MA 093, São Paulo, Brazil) utilizando solução hidroetanólica acidificada com ácido cítrico. A razão sólido:líquido (1:10), a velocidade de agitação (200 rpm) e o tempo de extração (1 h) foram fixadas de acordo com Caldas *et al.* (2018). Após a remoção dos sólidos suspensos por filtração, os extratos foram armazenados a -20°C para posterior análise.

2.3 Métodos analíticos

2.3.1 Teor de compostos fenólicos totais (CFT)

O teor de CFT nos extratos foi determinado com o reagente Folin-Ciocalteu de acordo com método descrito por Georgé *et al.* (2005). A leitura da absorbância foi realizada a 760 nm em espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em mg equivalentes ao ácido gálico (EAG) por 100 g de farinha da casca de uva.

2.3.2 Teor de antocianinas monoméricas (AM)

A determinação do teor de AM nos extratos foi realizada pela metodologia de pH diferencial conforme o método descrito por Giusti e Wrolstad (2001). A absorvância foi medida a 520 e 700 nm em espectrofotômetro (SPECORD 205, Analytik Jena AG, Alemanha). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em mg de pigmentos monoméricos equivalentes à malvidina-3-*O*-glicosídeo (coeficiente de extinção molar de 29500 L.cm⁻¹.mol⁻¹ e peso molecular de 562,5 g.mol⁻¹) por 100 g de farinha de casca de uva.

2.3.3 Capacidade antioxidante pelo método ORAC

A determinação da capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) foi baseada no método descrito por Zulueta *et al.* (2009) em leitor de fluorescência TECAN Infinite® 200 Series (Tecan, Männedorf, Switzerland). A fluoresceína foi usada como referência e o dicloridrato de 2,2-Azobis(2-metilpropionamida) (AAPH) como gerador de radicais peroxila. A intensidade da fluorescência ($\lambda_{exc}= 485\text{nm}$, $\lambda_{em}= 535 \text{ nm}$) foi monitorada cada minuto, em modo cinético, até obter um valor de fluorescência 5% inferior à leitura inicial. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em μmol equivalentes ao Trolox (ET) por g de farinha de casca de uva.

2.3.4 Capacidade antioxidante pelo método ABTS^{•+}

A capacidade antioxidante dos extratos também foi avaliada pelo método descrito por Re *et al.* (1999). A absorvância foi medida a 734 nm em espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em μmol equivalentes ao Trolox (ET) por g de farinha da casca de uva.

2.4 Planejamento experimental

Foi utilizada a Metodologia de Superfície Resposta (MSR) para estudar a influência da temperatura, a concentração de etanol e concentração de ácido cítrico sobre a composição do extrato. Os efeitos principais, efeitos quadráticos e os efeitos de interação foram avaliados usando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2³. Para cada fator foram avaliados cinco níveis, incluindo 8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 17 ensaios (Tabela 1). Os níveis dos fatores foram determinados em ensaios preliminares, como: temperatura (23–57 °C), concentração de etanol (16–84%) e concentração de ácido cítrico (0–4%). Foi utilizada uma equação polinomial de segunda ordem para expressar a variável resposta em função das variáveis independentes ou fatores.

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 ,$$

onde y é a variável dependente ou resposta: teor de compostos fenólicos totais, teor de antocianinas monoméricas e capacidade antioxidante (ORAC e ABTS^{•+}); β_0 é o valor da resposta no ponto central ou intercepto; $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ são os coeficientes de regressão lineares da temperatura, concentração de etanol e concentração de ácido cítrico; $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ são os coeficientes quadráticos; $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ são os coeficientes de interação e x_1, x_2 e x_3 são as variáveis independentes (temperatura, concentração de etanol e concentração de ácido cítrico, respectivamente).

2.5 Otimização e validação dos modelos

Como estratégia para obtenção de um extrato rico em compostos fenólicos e antocianinas e também com elevada capacidade antioxidante foi utilizado o método de otimização de múltiplas respostas, que permite otimizar simultaneamente as quatro variáveis dependentes envolvidas no processo de extração, maximizando todas as respostas dentro dos limites experimentais. As condições operacionais ótimas foram obtidas pela combinação das respostas individuais em uma função composta otimizada: a função desejabilidade (Candiotti *et al.*, 2014). O valor dessa função varia numa escala de 0 a 1, onde 0 representa uma resposta completamente inaceitável enquanto 1 representa a resposta mais desejada (Bezerra *et al.*, 2008). Para validar os modelos matemáticos, foram realizados ensaios confirmatórios de determinação do teor de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas e também em relação à capacidade antioxidante (ORAC e ABTS^{•+}) no extrato obtido nas condições selecionadas como mais adequadas. Finalmente, os valores experimentais e preditos pelos modelos foram comparados.

2.6 Análises estatísticas

Todos os resultados foram reportados como média \pm desvio padrão ($n = 3$). Foram realizados a análise de variância (ANOVA) e o teste F (Fischer) para verificar a adequação dos modelos. Também foram obtidos os coeficientes de regressão e os coeficientes de determinação (R^2 e R^2 ajustado), gerando tanto as superfícies de resposta quanto os perfis da função desejabilidade para otimização das respostas. A relação entre os ensaios para determinação dos compostos bioativos (CFT e AM) e da capacidade antioxidante (ORAC e ABTS^{•+}) foi avaliada por correlação linear de Pearson. Para todas as análises estatísticas, utilizou-se o programa *Statistica* 10.0 (StatSoft, Tulsa, EUA) com o nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados dos teores de CFT e AM bem como da capacidade antioxidante medida pelos métodos ORAC e ABTS^{•+} dos extratos obtidos nas diferentes condições de extração.

Os coeficientes de regressão codificados da equação polinomial de segunda ordem, os valores de p para o teste F (Fischer), os coeficientes de determinação (R^2) e os coeficientes de determinação ajustados (R^2 aj) para cada variável resposta são mostrados na Tabela 2. Para verificar a adequação e ajuste dos modelos, foram excluídos os termos não significativos (Candiotti *et al.*, 2014) e as equações resultantes foram avaliadas por análise de variância (ANOVA). Todos os modelos foram adequados na predição do comportamento das variáveis de resposta em relação às variáveis independentes: a falta de ajuste do modelo foi não significativa ($p > 0,05$), e os coeficientes de determinação foram satisfatórios (R^2 aj $> 0,76$).

3.1 Teor de compostos fenólicos totais (CFT)

O teor de CFT nos extratos variou de 951,78 a 4038,86 mg EAG/100 g de casca de uva (Tabela 1), valores inferiores aos obtidos por Tournour *et al.* (2015), que avaliaram a extração dos compostos fenólicos a partir do bagaço de diferentes cultivares de uva usando como solvente etanol/água (80% v/v) sob agitação mecânica, porém com um tempo de extração muito superior ao do presente trabalho (48 horas) (6930 mg–13170 mg EAG/100 g de bagaço de uva).

Vários autores reportaram valores superiores de rendimentos na extração de compostos fenólicos quando utilizaram metanol (Pinelo *et al.*, 2005), solução metanólica 60% v/v (Arnous e Meyer, 2008) e solução metanólica acidificada com ácido clorídrico (HCl) (Rockenbach, Rodrigues, *et al.*, 2011). Contudo, devido à toxicidade deste solvente, neste trabalho optou-se pelo uso do etanol, um solvente não tóxico que viabiliza a posterior aplicação dos extratos para fins alimentícios. Pelo mesmo motivo, o agente acidificante utilizado foi o ácido cítrico, aditivo de baixo custo e muito usado na indústria alimentícia (Brazinha *et al.*, 2014). Além disso o ácido cítrico está presente de forma natural no vinho, sendo o segundo ácido orgânico mais abundante (Kocabey *et al.*, 2016). Tanto o etanol quanto o ácido cítrico são considerados como “naturais” uma vez que podem ser recuperados a partir do próprio bagaço de uva (Kammerer *et al.*, 2014).

A influência das variáveis de processo sobre o teor de CFT está apresentada na Figura 1a-c. O uso de altas temperaturas favoreceu a extração devido ao aumento tanto da solubilidade do soluto quanto do coeficiente de difusão dos compostos fenólicos. Quanto maior for a temperatura, menor será o coeficiente de viscosidade dinâmica e maior o coeficiente de transferência de massa (Cacace J. e Mazza, G., 2003; Pinelo *et al.*, 2005). O uso de maiores concentrações de ácido cítrico aumentou levemente a extração de compostos fenólicos totais.

Os maiores conteúdos de compostos fenólicos (Figura 1a e 1b) foram verificados nos valores médios de concentração de etanol na faixa estudada (50% v/v). Este comportamento também foi reportado por Sant’anna *et al.* (2012) ao estudar a extração dos compostos fenólicos do bagaço de uva proveniente da produção de suco da variedade Isabel, e por Caldas *et al.* (2018) na extração de compostos fenólicos da casca de uva da variedade Syrah. Os autores atribuíram essa tendência às diferenças quanto a estrutura e polaridade dos grupos de compostos fenólicos presentes na casca de uva. A natureza polar dos polifenóis (presença de grupos hidroxilo) facilita a sua solubilização em meios polares tais como soluções hidroalcoólicas (Fontana *et al.*, 2013). Na extração de compostos fenólicos a partir de sementes de uva, misturas de solventes contendo pelo menos 50% v/v de água foram mais eficientes que a extração com sistema de solvente mono-componente (Yilmaz e Toledo, 2006).

De acordo com os trabalhos desenvolvidos por Cacace and Mazza (2003a) e Čujić *et al.* (2016), os sistemas de solventes binários (etanol/água) foram mais eficazes que sistemas de solventes mono-componente (etanol ou água pura) na extração de compostos fenólicos de groselhas pretas congeladas e arônias secas, respectivamente. As misturas de água e etanol apresentam um efeito sinérgico: a água intumescer os tecidos vegetais e aumenta a permeabilidade das membranas celulares enquanto que o etanol quebra as ligações entre os solutos e a matriz vegetal, o que aumenta a transferência de massa por difusão molecular e facilita a extração dos compostos fenólicos (Fontana *et al.*, 2013; Čujić *et al.*, 2016). Cacace J. E. e Mazza, G. (2003) também reportaram que a concentração de etanol no solvente afetou a extração dos compostos fenólicos de groselhas pretas congeladas. Tem sido observado que para extrair os flavonóis (moléculas covalentes não polares) que possuem baixa solubilidade em água é necessário incrementar a concentração de etanol para reduzir a sua constante dielétrica e dessa forma a energia necessária para quebrar o arranjo na molécula de água será menor, o que resulta em um aumento da solubilidade (Cacace J. e Mazza, G., 2003).

Tabela 1 Valores reais e codificados das variáveis independentes no delineamento composto central rotacional e resultados observados

Ensaio	Temperatura (°C)	Concentração de etanol (%)	Concentração de ácido cítrico (%)	^a CFT	^b AM	^c ORAC	^d ABTS ^{•+}
1	30 (-1)	30 (-1)	0,8 (-1)	1387,34 ± 66,23	65,81 ± 1,78	142,51 ± 15,22	70,71 ± 1,07
2	30 (-1)	30 (-1)	3,2 (+1)	1606,93 ± 43,20	76,08 ± 5,94	120,89 ± 0,74	80,07 ± 1,68
3	30 (-1)	70 (+1)	0,8 (-1)	1873,60 ± 9,46	144,05 ± 2,64	236,01 ± 8,70	103,15 ± 2,36
4	30 (-1)	70 (+1)	3,2 (+1)	2319,01 ± 43,20	150,61 ± 6,47	213,32 ± 5,22	98,59 ± 2,40
5	50 (+1)	30 (-1)	0,8 (-1)	2287,20 ± 50,06	88,15 ± 3,30	202,22 ± 7,27	103,15 ± 3,02
6	50 (+1)	30 (-1)	3,2 (+1)	2382,59 ± 25,03	107,00 ± 6,56	200,22 ± 11,45	115,92 ± 3,18
7	50 (+1)	70 (+1)	0,8 (-1)	2657,01 ± 68,83	163,19 ± 2,98	250,21 ± 6,05	136,04 ± 1,84
8	50 (+1)	70 (+1)	3,2 (+1)	2962,01 ± 103,37	161,17 ± 2,85	340,29 ± 9,85	140,02 ± 2,67
9	23 (-1,68)	50 (0)	2 (0)	2378,76 ± 103,94	142,38 ± 7,17	267,38 ± 7,59	122,14 ± 1,95
10	57 (+1,68)	50 (0)	2 (0)	4038,86 ± 116,80	149,33 ± 9,02	285,45 ± 17,81	180,92 ± 1,20
11	40 (0)	16 (-1,68)	2 (0)	951,78 ± 51,22	46,44 ± 0,79	129,06 ± 15,24	45,60 ± 1,53
12	40 (0)	84 (+1,68)	2 (0)	1510,76 ± 64,12	143,83 ± 0,70	204,21 ± 13,05	83,70 ± 3,56
13	40 (0)	50 (0)	0 (-1,68)	2109,14 ± 71,91	158,37 ± 11,19	264,48 ± 14,27	136,48 ± 3,83
14	40 (0)	50 (0)	4 (+1,68)	2848,33 ± 30,94	154,18 ± 1,35	233,55 ± 9,30	137,92 ± 4,16
15	40 (0)	50 (0)	2 (0)	2637,97 ± 162,16	163,60 ± 4,36	261,44 ± 7,35	148,25 ± 6,44
16	40 (0)	50 (0)	2 (0)	2422,88 ± 139,15	164,48 ± 5,89	256,86 ± 9,63	152,70 ± 4,60
17	40 (0)	50 (0)	2 (0)	2513,49 ± 130,56	141,90 ± 10,69	271,75 ± 12,69	149,69 ± 3,34

Resultados expressos como média ± desvio padrão ($n = 3$).

^a CFT: Compostos fenólicos totais (mg equivalentes ao ácido gálico [EAG].100 g⁻¹ farinha da casca seca)

^b AM: Antocianinas monoméricas (mg de malvidina-3-*O*-glicosídeo [Mv3gl]. 100 g⁻¹ farinha da casca seca)

^c ORAC: Capacidade de absorção do radical oxigênio (μmol equivalentes ao Trolox [ET].g⁻¹ farinha da casca seca)

^d ABTS^{•+}: Atividade sequestradora do radical catiônico (μmol equivalentes ao Trolox [ET].g⁻¹ farinha da casca seca)

Tabela 2 Coeficientes de regressão e análise do modelo para os teores de compostos fenólicos totais e de antocianinas monoméricas e para a capacidade antioxidante (ORAC e ABTS^{•+})

Coeficientes	^a CFT	^b AM	^c ORAC	^d ABTS ^{•+}
β_0	2480,17	148,48	257,12	148,64
β_1	431,57 (0,005)	N.S.	22,74 (0,008)	17,68 (0,001)
β_2	226,09 (0,016)	32,64 (0,011)	36,64 (0,003)	12,60 (0,002)
β_3	169,04 (0,029)	N.S.	N.S.	N.S.
β_{11}	229,67 (0,017)	N.S.	N.S.	N.S.
β_{22}	-469,50 (0,004)	-22,23 (0,024)	-35,96 (0,003)	-31,93 (0,0004)
β_{33}	N.S.	N.S.	N.S.	-6,28 (0,010)
β_{12}	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
β_{13}	N.S.	N.S.	16,55 (0,026)	N.S.
β_{23}	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
R^2	0,973	0,891	0,783	0,949
R^2_{aj}	0,961	0,876	0,763	0,931
valor p (teste F)	0,0003	0,0008	0,00009	0,00004
p (Falta de Ajuste)	0,402	0,560	0,059	0,095

^aCFT: valor dos coeficientes referente ao teor de compostos fenólicos totais (valor p)

^bAM: valor dos coeficientes referente ao teor de antocianinas monoméricas (valor p)

^cORAC: valor dos coeficientes referente à capacidade de absorção do radical oxigênio (valor p)

^dABTS^{•+}: valor dos coeficientes referente à atividade sequestradora do radical catiônico (valor p)

N.S.: não significativos ($p > 0,05$)

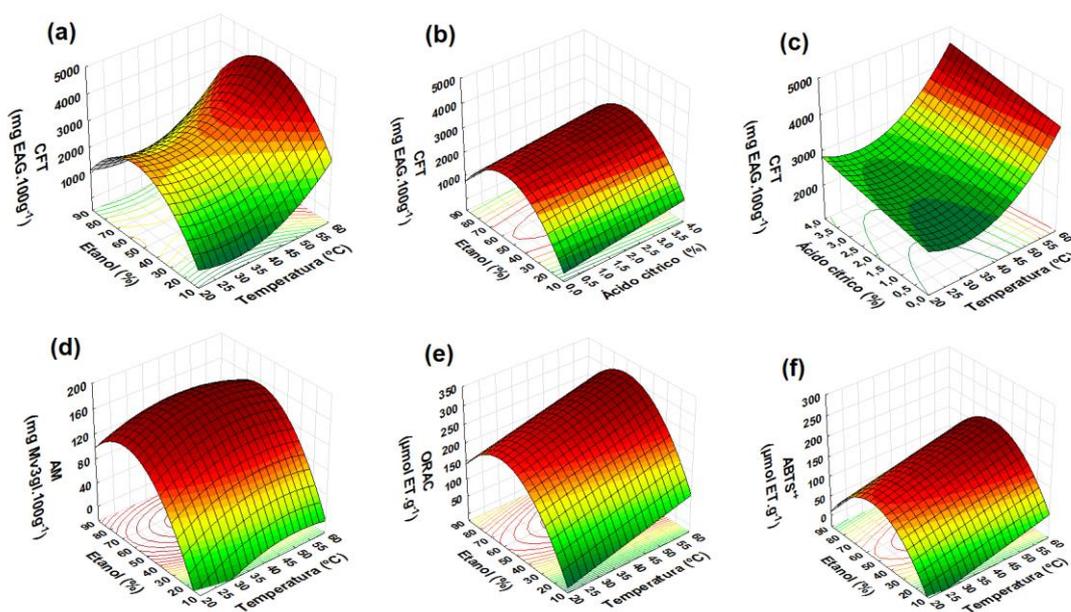


Figura 1 Gráficos de superfície de resposta que representam a influência do processo de extração sobre o teor de compostos fenólicos totais (CFT) (a-c), teor de antocianinas monoméricas (AM) (d) e na capacidade antioxidante medida pelos métodos ORAC (e) e ABTS^{•+} (f)

3.2 Teor de antocianinas monoméricas (AM)

A concentração de AM variou de 46,44 a 164,48 mg/100 g de casca de uva (Tabela 1). A extração das antocianinas foi influenciada significativamente ($p < 0,05$) somente pela concentração de etanol (Figura 1d). As maiores concentrações de AM foram obtidas quando se utilizou 50% de concentração de etanol. Esse comportamento foi similar ao observado na extração dos compostos fenólicos provavelmente devido a que as antocianinas constituem o grupo majoritário dentre os compostos fenólicos nas uvas da cv. Alicante Bouschet, o que pode contribuir para o aumento no teor de compostos fenólicos totais nesta variedade.

Na extração de antocianinas a partir de groselhas pretas, Cacace J. e Mazza, G. (2003) também observaram que o máximo rendimento foi alcançado usando 50% de etanol. De acordo com os autores, as antocianinas podem ser consideradas como moléculas iônicas, as quais permanecem na forma do cátion *flavilium* no pH ácido. Portanto, essas moléculas requerem menor concentração de etanol que outros grupos de compostos fenólicos para se dissolver no meio de extração.

No presente estudo, a adição de ácido cítrico não teve influência na extração das antocianinas. Srinivas *et al.* (2011) também reportaram que a adição de ácido cítrico não teve um efeito significativo na extração de antocianinas, com solução hidroetanólica em diferentes concentrações, a partir do bagaço de uva da cultivar Sunbelt (*Vitis labrusca* L.).

3.3 Capacidade antioxidante pelo método ORAC

A capacidade antioxidante determinada pelo método ORAC foi significativamente ($p < 0,05$) afetada pela temperatura e pela concentração de etanol. De acordo com a Figura 1e, a capacidade antioxidante aumentou com o aumento da temperatura. As temperaturas elevadas possibilitaram uma maior extração dos compostos com atividade antioxidante, o que poderia ser explicado por um aumento da solubilidade dos mesmos com o aumento da temperatura, conforme já discutido. Essa tendência foi similar à observada para a extração dos CFT e AM sugerindo que esses compostos provavelmente são responsáveis pela atividade antioxidante contra os radicais peroxila e hidroxila.

Quanto à influência da concentração de etanol, tem sido reportado que extratos hidroetanólicos apresentam maior capacidade antioxidante que extratos aquosos avaliados por este método (Pérez-Jiménez e Saura-Calixto, 2006). A capacidade antioxidante, obtida pelo método ORAC, variou de 120,89 a 340,29 $\mu\text{mol ET/g}$ casca de uva (Tabela 1), resultados superiores aos reportados por Yilmaz e Toledo (2006) ao analisarem extratos de casca de uva das variedades Chardonnay (102,8 $\mu\text{mol ET/g}$ de casca de uva) e Merlot (69,8 $\mu\text{mol ET/g}$ de casca de uva) usando água e acetona como solventes. Rockenbach, Gonzaga, *et al.* (2011) avaliaram a capacidade antioxidante medida pelo método ORAC no bagaço (cascas e sementes) de diferentes uvas tintas usando mistura de água/metanol acidificada com ácido acético. Os extratos apresentaram valores entre 20,76 e 85,17 $\mu\text{mol TE/g}$ de bagaço, resultados inferiores aos obtidos neste estudo e com a desvantagem do uso do metanol, um solvente tóxico que limita a aplicação dos extratos em alimentos. Da mesma forma que para os teores de CFT e de AM, os maiores valores de ORAC foram observados para concentrações de etanol ao redor de 50%.

3.4 Capacidade antioxidante pelo método ABTS^{•+}

A capacidade antioxidante determinada pelo método ABTS^{•+} também foi influenciada significativamente ($p < 0,05$) pela concentração de etanol e pela temperatura de extração. A

adição de ácido cítrico à solução extratora não teve efeito significativo ($p > 0.05$) na capacidade antioxidante medida por ABTS^{•+}.

Os extratos exibiram maior capacidade de sequestro dos radicais ABTS^{•+} quando extraídos com soluções hidroetanólicas a 50% v/v e a maiores temperaturas (Figura 1f). As semelhanças entre as superfícies de resposta obtidas para a extração dos compostos bioativos e a capacidade antioxidante poderiam indicar que os compostos fenólicos e antocianinas monoméricas presentes na casca de uva agem como sequestradores dos radicais ABTS^{•+}. Esse comportamento foi previamente reportado por Caldas *et al.* (2018), que também estudaram a influência da concentração de etanol na extração de compostos fenólicos da casca de uva, subproduto da elaboração de vinhos espumantes.

Rockenbach, Rodrigues, *et al.* (2011) avaliaram a capacidade antioxidante medida por ABTS^{•+} em diferentes bagaços de uvas usando metanol acidificado (0,1% HCl). Os valores observados estiveram na faixa de 193,4–485,4 $\mu\text{mol ET/g}$ casca de uva, sendo maiores que os encontrados no presente estudo (45,6–180,9 $\mu\text{mol ET/g}$ de casca de uva), porém o uso de reagentes tóxicos como metanol e ácido clorídrico impede a posterior aplicação dos extratos em alimentos.

3.5 Correlação entre as propriedades avaliadas

A fim de se avaliar as possíveis correlações entre os compostos bioativos extraídos e sua capacidade antioxidante, foram determinados os coeficientes de correlação de Pearson. Os resultados aparecem listados na Tabela 3.

Tabela 3 Coeficientes de correlação de Pearson entre o teor de compostos fenólicos totais, antocianinas monoméricas e a capacidade antioxidante (ORAC e ABTS^{•+})

	^a CFT	^b ORAC	^c ABTS ^{•+}	^d AM
^a CFT	1			
^b ORAC	0,765	1		
^c ABTS ^{•+}	0,906	0,847	1	
^d AM	0,652	0,851	0,786	1

Números em negrito indicam correlação significativa de acordo com o coeficiente de correlação de Pearson ($p < 0,05$). ^a CFT: Compostos fenólicos totais (mg de ácido gálico equivalente [AGE].100 g⁻¹ farinha da casca seca). ^b AM: Antocianinas monoméricas (mg de malvidina-3-*O*-glicosídeo [Mv3gl]. 100 g⁻¹ farinha da casca seca). ^c ORAC: Capacidade de absorção do radical oxigênio (μmol equivalentes ao Trolox [ET].g⁻¹ farinha da casca seca). ^d ABTS^{•+}: Atividade sequestradora do radical catiônico (μmol equivalentes ao Trolox [ET].g⁻¹ farinha da casca seca)

Como observado na Tabela 3, os teores de CFT e AM apresentaram uma correlação positiva significativa ($p < 0,05$) com a capacidade antioxidante medida pelos métodos ABTS^{•+} e ORAC, com coeficientes superiores a 0,7; o que indica uma forte correlação entre essas variáveis (Mukaka, 2012). Estes resultados sugerem que os compostos fenólicos e, mais especificamente, as antocianinas monoméricas, podem ser responsáveis pela capacidade sequestradora de radicais ABTS^{•+} e radicais peroxila dos extratos analisados. Também foi observada uma correlação positiva e significativa ($p < 0,05$) entre a capacidade antioxidante

medida por ambos os métodos ($r = 0,847$), o que confirma a tendência descrita pelos gráficos de superfície de resposta para estas variáveis.

3.6 Seleção das melhores condições e validação dos modelos

De acordo com as superfícies de resposta obtidas, as melhores condições para cada resposta apareceram localizadas em diferentes regiões do espaço experimental. Nesse caso, fica difícil definir, por simples superposição das superfícies de resposta, os valores operacionais ideais das variáveis independentes que satisfaçam simultaneamente todos os requisitos desejados para as variáveis dependentes. Portanto, foi utilizado o método de otimização com restrição que avalia as funções desejabilidade individuais e global (Bezerra *et al.*, 2008; Candioti *et al.*, 2014). Assim, todas as variáveis de resposta foram maximizadas para obter as condições de extração mais adequadas na faixa estudada.

A Figura 2 ilustra os perfis das desejabilidades individuais e global nas condições de extração estudadas. A desejabilidade global atingida foi igual a 0,70, correspondendo às condições operacionais que geraram uma maior resposta (extratos com máximo teor de compostos bioativos e máxima capacidade antioxidante). Desta forma, os valores mais adequados encontrados para a extração foram: temperatura de 40 °C, concentração de etanol de 50% v/v e concentração de ácido cítrico de 2% m/v na solução extratora. Nessas condições, os valores experimentais do teor de CFT (2678,50 mg EAG.100 g⁻¹ casca), teor de AM (148,55 mg de Mv3gl.100 g⁻¹ casca), capacidade antioxidante por ORAC (296,92 μmol ET.g⁻¹ casca) e por ABTS⁺ (144,24 μmol ET.g⁻¹ casca) foram próximos dos valores preditos pelo planejamento experimental: teor de CFT (2479,98 mg EAG.100 g⁻¹ casca), teor de AM (148,43 mg Mv3gl.100 g⁻¹ casca), capacidade antioxidante por ORAC (256,93 μmol ET.g⁻¹ casca) e por ABTS⁺ (143,04 μmol ET.g⁻¹ casca), com coeficientes de variação menores que 10%. Os resultados indicam que os modelos quadráticos foram adequados para a predição das respostas avaliadas, dentro dos intervalos estudados.

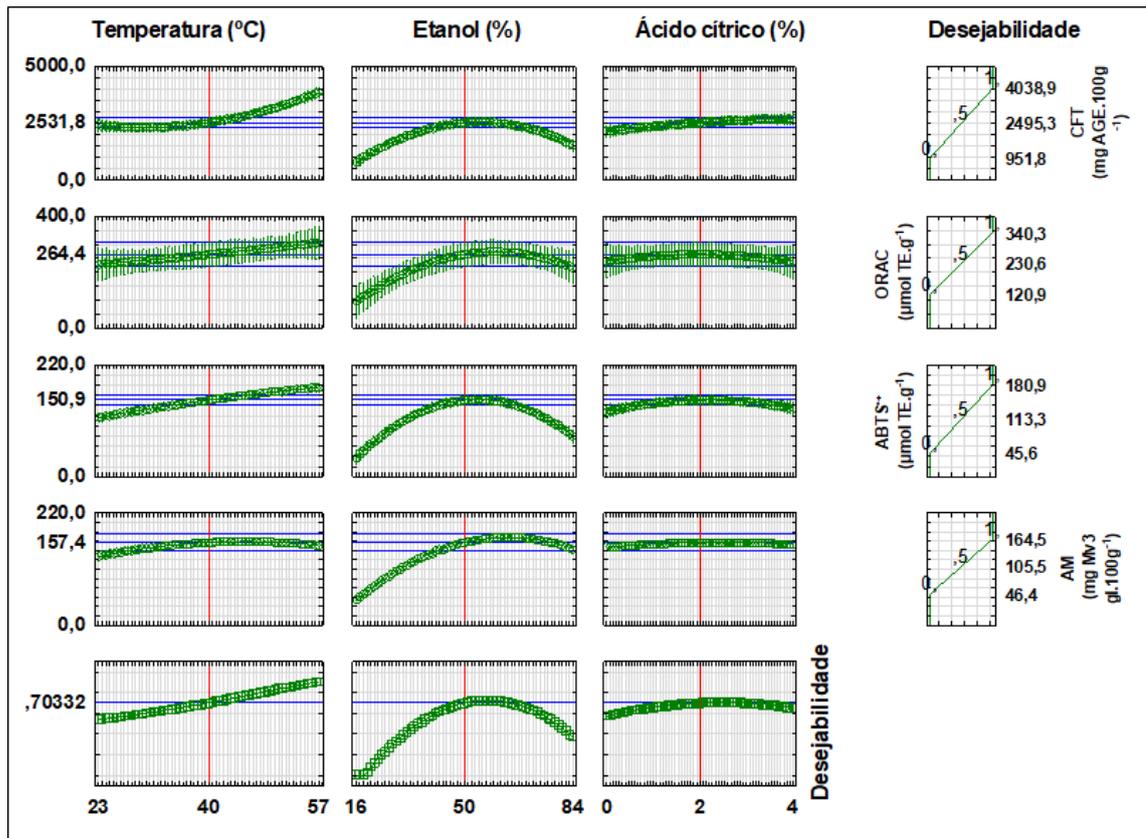


Figura 2 Perfis para os valores preditos das desejabildades individuais e global na otimização da extração

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO, ESTABILIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE UM EXTRATO LÍQUIDO CONCENTRADO OBTIDO DA CASCA DE UVA CV. ALICANTE BOUSCHET (*VITIS VINIFERA* L.)

RESUMO

A uva Alicante Bouschet (*Vitis vinifera* L.) é uma cultivar tintoreira com elevado teor de antocianinas na casca e na polpa, que tem sido usada para a produção de vinhos no semiárido do Brasil. Esta atividade gera muitos subprodutos ainda ricos em compostos fenólicos, principalmente antocianinas. Os objetivos deste estudo foram caracterizar, avaliar a estabilidade e a atividade antimicrobiana *in vitro* de um extrato líquido concentrado obtido a partir da casca da uva, visando valorizar esse subproduto como fonte potencial de corantes naturais. O extrato líquido de casca de uva foi obtido por extração sólido-líquido e depois, concentrado por rotaevaporação. A identificação e quantificação dos compostos fenólicos do extrato foi realizada por Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). A estabilidade do extrato a elevadas temperaturas foi avaliada por análise termogravimétrica e também durante 60 dias de estocagem a baixas temperaturas mediante análise de antocianinas por pH diferencial e cor instrumental. Para avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato foi utilizada a técnica de difusão em poços. As antocianinas foram os compostos fenólicos encontrados em maior concentração no extrato, com destaque para malvidina-3-*O*-(6-*O*-*p*-cumaroil)-glicosídeo e malvidina-3-*O*-glicosídeo. Na análise termogravimétrica foi observada a maior perda de massa do extrato a 152 °C, referente à possível degradação do ácido cítrico e das antocianinas. O extrato apresentou uma tonalidade roxa avermelhada escura e opaca que permaneceu estável até os 45 dias de estocagem a -18 °C e durante os primeiros 15 dias a 5 °C. Aos 30 dias da estocagem a 5 °C e aos 60 dias a -18 °C observou-se uma mudança na tonalidade do extrato para vermelha escura e opaca. O teor de antocianinas monoméricas variou de 270,02 mg.L⁻¹ no tempo inicial para 224,95 mg.L⁻¹ (-18 °C) e 160,81 mg.L⁻¹ (5 °C) durante os 60 dias de estocagem. Como esperado, a estocagem em congelamento foi mais eficiente na manutenção da estabilidade do extrato em relação ao teor de antocianinas monoméricas e, conseqüentemente, manteve suas características cromáticas. O extrato inibiu o crescimento das bactérias testadas, sendo mais efetivo contra *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chave: uva Alicante Bouschet, extrato de casca de uva, atividade antimicrobiana, estabilidade, antocianinas, cor

ABSTRACT

The Alicante Bouschet (*Vitis vinifera* L.) is a grape cultivar with high anthocyanin content in both pulp and skin, which has been used for the production of wines in the Brazilian semi-arid region. This activity generates many residues, still rich in phenolic compounds, mainly anthocyanins. The objective of this study was to characterize, evaluate the stability and the *in vitro* antimicrobial activity of a concentrated liquid extract obtained from the Alicante Bouschet grape skin, aiming to valorize this byproduct as a potential source of natural dyes. The liquid grape skin extract was obtained by solid-liquid extraction and then concentrated using vacuum evaporation. Phenolic compounds were analyzed by high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). The stability of the extract at high temperatures was evaluated by thermogravimetric analysis. The storage stability of extract was studied at low temperatures during 60 days by evaluating monomeric anthocyanins by differential pH method and color. *In vitro* antimicrobial activity of the extract was assessed by the agar well diffusion method. The anthocyanins were the major phenolic compounds in the extract, mainly malvidin-3-O-(6-O-*p*-coumaroyl)-glucoside and malvidin-3-O-glucoside. In the thermogravimetric analysis, the largest loss of mass of the extract was observed at 152 °C, relating to the possible degradation of citric acid and anthocyanins. The purple-reddish dark and opaque color of the extract remained stable under freezing at -18 °C for up to 45 days of storage but was less stable under refrigeration at 5 °C (15 days). Total monomeric anthocyanin content varied from 270.02 mg.L⁻¹ at the initial time to 224.95 mg.L⁻¹ (-18 °C) and 160.81 mg.L⁻¹ (5 °C) after 60 days of storage. These results indicated that, as expected, the storage at freezing temperature was more efficient to maintain the extract stability, regarding its coloring properties. The extract inhibited the growth of the bacteria tested, being more effective against *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Alicante Bouschet grape, grape skin extract, antimicrobial activity, stability, Alicante Bouschet, anthocyanins, color

1 INTRODUÇÃO

A uva da variedade Alicante Bouschet (*Vitis vinifera* L.), também conhecida como Garnacha Tintorera, é um híbrido desenvolvido na França, a partir do cruzamento entre as variedades Petit Bouschet e Grenache. É uma das poucas cultivares *Vitis vinifera* com casca e polpa vermelhas, as quais são conhecidas como tintureiras. Essa característica faz que o esmagamento das uvas Alicante Bouschet produza mostos de cor vermelha e conseqüentemente vinhos intensamente coloridos (Castillo-Muñoz *et al.*, 2009; Figueiredo-González *et al.*, 2014; Revilla *et al.*, 2016). Embora a espécie Alicante Bouschet possa ser usada para elaborar vinhos dessa única variedade, a uva é mais usada em cortes para incrementar a cor de vinhos tintos menos coloridos elaborados com outras variedades de uvas (Castillo-Muñoz *et al.*, 2009; Jubileu *et al.*, 2010; Dardeau, 2015; Revilla *et al.*, 2016).

A intensa cor vermelho-violeta dos vinhos elaborados a partir da uva Alicante Bouschet está muito relacionada com a sua composição fenólica, principalmente a presença e concentração das antocianinas e outros compostos fenólicos que são extraídos das cascas e polpas das uvas durante a vinificação (Castillo-Muñoz *et al.*, 2009). As antocianinas pertencem ao grupo dos flavonoides, caracterizado pelo esqueleto carbônico $C_6C_3C_6$, e são responsáveis pelas cores azuis, roxas, vermelhas, laranja e rosa em flores e frutos (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009). Esses pigmentos são derivados glicosilados do cátion 2-fenil-benzopirano, também conhecido como cátion *flavilium*. As antocianinas se diferenciam principalmente quanto ao número de grupos hidroxila e/ou metoxila presentes, além do tipo, número e sítio de ligação dos açúcares na molécula. Também existem diferenças quanto aos tipos e números de ácidos aromáticos ou alifáticos que estão ligados aos açúcares da molécula, principalmente no C-3 ou esterificados ao 6-OH (Schwartz *et al.*, 2010). Os diferentes substituintes na molécula, como o padrão de substituição dos grupos hidroxila e metoxila no anel B na molécula das antocianinas e o padrão de acilação, influenciam na cor e também na estabilidade das antocianinas, uma vez extraídas da matriz vegetal (Giusti e Wrolstad, 2003; Fournier-Level *et al.*, 2011; Han e Xu, 2015; Tang *et al.*, 2017). Isto influencia na estabilidade da cor dos vinhos (He *et al.*, 2012) e também dos extratos obtidos a partir dos subprodutos da vinificação.

As antocianinas identificadas nas uvas Alicante Bouschet consistem principalmente em derivados monoglicosilados da malvidina, peonidina, delphinidina, petunidina e cianidina. Nas cascas predominam a malvidina-3-*O*-glicosídeo, seguida da peonidina-3-*O*-glicosídeo enquanto que na polpa foi reportada a peonidina-3-*O*-glicosídeo como a antocianina majoritária. As antocianinas aciladas com ácido *p*-cumárico representam o grupo mais importante dentro das antocianinas aciladas reportadas nas cascas desta variedade (Castillo-Muñoz *et al.*, 2009; Falginella *et al.*, 2012). As reações de co-pigmentação entre antocianinas e também entre antocianinas e outros compostos fenólicos (flavonóis e ácidos hidroxicinâmicos) resultam em novos pigmentos mais estáveis que as antocianinas nativas, responsáveis pela intensidade da cor dos vinhos jovens (Castillo-Muñoz *et al.*, 2009).

Somente de 30 a 40% dos compostos fenólicos das uvas passam ao vinho e essa extração depende de diferentes fatores como a variedade da uva, a região geográfica e a tecnologia de vinificação aplicada. Assim, vários estudos têm reportado que uma parte importante desses compostos ainda permanecem parcialmente retidos no bagaço após o processo de vinificação, principalmente na casca e na polpa remanescente (García-Beneytez *et al.*, 2002; Amico *et al.*, 2004; Kammerer *et al.*, 2004; Amendola *et al.*, 2010; Ky *et al.*, 2014; Apolinar-Valiente *et al.*, 2015; De La Cerda-Carrasco *et al.*, 2015; Lingua *et al.*, 2016; Favre *et al.*, 2019).

Durante a vinificação, as antocianinas aciladas, principalmente as *p*-coumariladas, são pouco extraídas das uvas para o vinho e, portanto, permanecem nos bagaços em maior

concentração (Ky *et al.*, 2014; Favre *et al.*, 2019). As antocianinas metoxiladas e di-metoxiladas também são menos extraídas durante a vinificação, mas uma vez extraídas resultaram estáveis no vinho (Favre *et al.*, 2019). Esses compostos remanescentes, assim como outros formados por reações de copigmentação, influenciam na expressão da cor dos extratos da mesma forma como acontece nos vinhos. Isto sugere que o bagaço de uva da cv. Alicante Bouschet poderia ser aproveitado para a obtenção de extratos que possam ser usados como corantes naturais em alimentos.

A cor é uma das primeiras características do alimento percebidas pelos sentidos e, portanto, o principal atributo a ser julgado pelos consumidores para avaliar a qualidade do alimento e a sua aceitabilidade (Giusti e Wrolstad, 2003; Schwartz *et al.*, 2010; Pathare *et al.*, 2013). O desenvolvimento de corantes à base de antocianinas que exibam melhores cores e maior estabilidade tem sido foco da atenção da indústria alimentar na procura de novos ingredientes de origem natural. O uso das antocianinas oferece diferentes vantagens: são substâncias inócuas e solúveis em água, o que facilita a sua incorporação em meio aquoso e as converte numa opção interessante como corantes naturais hidrossolúveis (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009; Markakis, 2012).

Além disso, têm sido atribuídos vários efeitos benéficos ao consumo tanto das uvas quanto do uso de suplementos à base de subprodutos como o bagaço de uva, que incluem atividades antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatória, antidiabética, anticâncer, como também efeitos neuro-, cardio- e hepatoprotetores (Hogan *et al.*, 2010; Granzotto e Zatta, 2014; Nassiri-Asl e Hosseinzadeh, 2016; Gonçalves *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2018). Assim, os extratos ricos em antocianinas constituem uma alternativa atrativa para a substituição dos corantes sintéticos, cujo uso em alimentos tem sido amplamente questionado por provocar danos à saúde (Giusti e Wrolstad, 2003; Chou *et al.*, 2007).

Porém, as antocianinas são altamente instáveis e susceptíveis à degradação quando extraídas da matriz vegetal (Giusti e Wrolstad, 2003), o que limita o uso destes pigmentos em alimentos. A estabilidade das antocianinas é afetada por diferentes fatores intrínsecos como estrutura química, concentração, padrões de glicosilação e acilação da molécula e também fatores extrínsecos como pH, temperatura de estocagem, luz, oxigênio, solventes dentre outros (Giusti e Wrolstad, 2003; Castaneda-Ovando *et al.*, 2009). Tem sido reportado que sob condições ácidas ($\text{pH} < 3$), as diferenças estruturais como o padrão de glicosilação e de acilação das antocianinas impactam diretamente nas características espectrais e nos atributos da cor dos extratos (Giusti e Wrolstad, 2003). A estabilidade das antocianinas provenientes de diversas matrizes é maior a pH ácido, onde predomina a forma vermelha do cátion *flavilium* e a baixas temperaturas (Giusti e Wrolstad, 2003). Dentre os fatores extrínsecos, a temperatura de estocagem tem sido reconhecida como o principal fator responsável pela degradação das antocianinas e, conseqüentemente, a perda da cor dos alimentos (Turker *et al.*, 2004). Desse modo, é de grande importância para o controle da qualidade na indústria monitorar as mudanças na cor e na concentração das antocianinas durante o processamento e estocagem dos alimentos (Wrolstad *et al.*, 2005).

Vários trabalhos da literatura estudam a composição fenólica de uvas e vinhos (Castillo-Muñoz *et al.*, 2009) e também dos subprodutos (Ky *et al.*, 2014) da cultivar Alicante Bouschet em climas temperados e tradicionais no cultivo de uvas e produção de vinhos. Padilha *et al.* (2016) estudaram a composição de vinhos e Ribeiro *et al.* (2018) caracterizaram os subprodutos da vinificação a partir da cv. Alicante Bouschet produzidos no clima semiárido do Vale do Submédio do São Francisco (VSF), no nordeste do Brasil.

Diante deste cenário, os objetivos deste trabalho foram caracterizar o extrato líquido concentrado de casca de uva, subproduto da vinificação em tinto das uvas da variedade Alicante

Bouschet, quanto às características físico-químicas, teor de compostos fenólicos totais, antocianinas monoméricas e atividade antioxidante. Assim como caracterizar o extrato quanto ao perfil de compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e as características cromáticas mediante análise instrumental da cor. Outro objetivo foi avaliar a estabilidade do extrato frente a temperaturas elevadas mediante análise termogravimétrica e a estabilidade durante 60 dias de estocagem, a baixas temperaturas, mediante o estudo da cinética de degradação das antocianinas monoméricas e a avaliação dos parâmetros da cor.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima

O bagaço fresco (cascas, polpa residual e sementes) de uva da variedade Alicante Bouschet, proveniente da produção de vinho tinto, foi fornecido pela vinícola Santa Maria, do grupo ViniBrasil (Lagoa Grande, PE, Brasil). O bagaço foi previamente seco em secador convectivo de bandejas, a 60 °C por 24 horas. O material seco foi processado em uma despoldadeira Bonina 0.25 df (Itametal, Itabuna, Brasil) para separar as cascas das sementes. A casca foi moída em um moinho de discos (Perten Instruments AB, Huddinge, Suécia), obtendo-se a farinha da casca de uva com (D_{50}) de $521 \pm 78,9 \mu\text{m}$ determinado em um analisador de tamanho de partícula por difração a laser (Microtrac, modelo S3500, Nova Iorque, E.U.A.).

2.2 Preparação do extrato concentrado de casca de uva

A farinha da casca de uva foi submetida ao processo de extração sólido-líquido em banho termostático (Marconi - MA 093, São Paulo, Brasil) a 40 °C, utilizando solução hidroetanólica 50% (v/v) acidificada com 2% (m/v) de ácido cítrico, razão sólido:líquido de 1:10, sob agitação mecânica (200 rpm) durante uma hora. Após a extração, os sólidos suspensos foram removidos por filtração a vácuo. O extrato líquido foi concentrado em evaporador rotativo a vácuo (Büchi, Flawil, Suíça) a 50 °C e agitação de 40 rpm até remoção do etanol (aproximadamente até a metade do volume inicial do extrato). O extrato líquido concentrado foi armazenado a -20 °C em recipientes de cor âmbar para posterior análise.

2.3 Caracterização do extrato

2.3.1 Características físico-químicas

O extrato líquido concentrado de casca de uva foi caracterizado, por meio da análise de umidade (por secagem em estufa sob vácuo a 70 °C do extrato líquido misturado com areia até peso constante) (AOAC, 2000) e de cinzas (por calcinação do resíduo após a análise de umidade em mufla a 550 °C) (AOAC, 2000). A determinação do teor de sólidos solúveis (°Brix) foi realizada em refratômetro digital portátil (Atago®, modelo Pal-1 Co., Ltd., E.U.A.) e a densidade foi determinada a 20 °C em densímetro de bancada (Anton Paar, modelo DMA 48, Artisan®, Illinois, E.U.A.). Para as medidas de pH e acidez total foi utilizado um titulador automático previamente calibrado (modelo 785 DMP Titrino, Metrohm, Suíça). As determinações foram realizadas seguindo as metodologias propostas pela AOAC (2006).

2.3.2 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais no extrato líquido concentrado foi determinado com o reagente Folin-Ciocalteu de acordo com o método descrito por Singleton e Rossi (1965) e modificado por Georgé *et al.* (2005). Primeiramente, foram pipetados 500 µL do extrato ao qual adicionaram-se 2,5 mL de solução de Folin-Ciocalteu 10% (v/v). A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 2 minutos. Posteriormente, foram adicionados 2,0 mL de solução de carbonato de sódio 7,5%. Agitou-se em vórtex e levou-se ao banho termostático a 50 °C durante 15 minutos. Os tubos foram retirados e colocados em banho de gelo por 30 segundos. A leitura da absorbância foi realizada a 760 nm em espectrofotômetro (Shimadzu® UV-1800, Kyoto, Japão). O teor de compostos fenólicos totais foi determinado usando uma curva padrão de ácido gálico com concentrações de 5 a 100 mg/L ($y = 0,0105x + 0,0047$; $R^2=0,9998$). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em mg equivalentes ao ácido gálico (EAG) por L de extrato de uva.

2.3.3 Determinação do teor de antocianinas monoméricas por pH diferencial

A determinação do teor de antocianinas monoméricas no extrato líquido concentrado foi realizada pela metodologia de pH diferencial conforme o método descrito por Giusti e Wrolstad (2001). Os extratos foram diluídos em soluções tampões pH 1,0 (solução de cloreto de potássio acidificada com HCl) e pH 4,5 (solução de acetato de sódio acidificada com HCl). Após filtração, a absorbância foi medida a 520 e 700 nm em espectrofotômetro (SPECORD 205, Analytik Jena AG, Alemanha). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em mg de pigmentos monoméricos equivalentes a malvidina-3-*O*-glicosídeo (coeficiente de extinção molar de 29500 L.cm⁻¹.mol⁻¹ e peso molecular de 562,5 g.mol⁻¹) por L de extrato de uva.

2.3.4 Capacidade antioxidante pelo método ORAC

A determinação da atividade antioxidante total pelo método da Capacidade de Absorbância do Radical Oxigênio do inglês Oxygen Radical Antioxidant Capacity (ORAC) foi conduzida baseada no método descrito por Zulueta *et al.* (2009) em leitor de fluorescência com microplaca preta de 96 poços TECAN Infinite® 200 Series (Tecan, Männedorf, Suíça). O método ORAC se fundamenta na capacidade dos compostos antioxidantes de uma amostra de sequestrar os radicais peroxila gerados pelo dicloridrato de 2,2-Azobis(2-metilpropionamida) (AAPH), evitando a degradação da fluoresceína (probe molecular) e consequentemente o decaimento da intensidade da emissão da fluorescência. A atividade antioxidante no extrato líquido concentrado comparou-se ao ácido 6-hidroxi-2-5-7-8-tetrametilcromo 2-carboxílico (Trolox), antioxidante sintético hidrossolúvel utilizado como padrão na análise.

Para a análise dos compostos antioxidantes hidrofílicos, todas as soluções foram diluídas em tampão fosfato 75 mmol pH 7,4. Primeiramente, 80 µL dos extratos previamente diluídos ou das soluções padrões de Trolox foram misturados com 80 µL de fluoresceína (78 nmol) e colocados em cada poço. A microplaca foi inserida no fluorímetro a 37 °C sob agitação durante 10 minutos para a leitura da fluorescência. Após a pre-incubação, foram adicionados 40 µL solução de AAPH (221 mmol) em todos os poços excluindo os de referência (200 µL de fluoresceína pura). A intensidade da fluorescência ($\lambda_{exc}= 485\text{nm}$, $\lambda_{em}= 535\text{ nm}$) foi monitorada cada minuto, em modo cinético, até obter um valor de fluorescência 5% inferior à leitura inicial. Para calcular a área abaixo da curva (AUC) foram plotados os dados de fluorescência em relação ao tempo para todas as amostras, as soluções padrões de Trolox e o branco, usando o

programa GraphPad Prisma versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, E.U.A). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram calculados por interpolação na curva de calibração de Trolox com concentrações de 10 a 120 μmol ($y = 528347x + 7 \times 10^6$; $R^2=0,9877$) e expressos em μmol de ET (equivalente ao Trolox) por L de extrato de uva.

2.3.5 Capacidade antioxidante pelo método ABTS^{•+}

Para determinar a capacidade antioxidante no extrato líquido concentrado utilizou-se o método descrito por Re *et al.* (1999). Para o preparo do radical ABTS^{•+}, 5 mL da solução aquosa de ABTS (2,2' azino-bis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico) (7 mmol) foram misturados com 88 μL de persulfato de potássio (140 mmol). A solução foi armazenada no escuro, à temperatura ambiente, durante 16 horas antes do uso. O radical ABTS^{•+} foi diluído em etanol 95% v/v e mantido em agitação constante até obter-se uma medida de absorbância de $0,700 \pm 0,020$ em 734 nm. Para análise, 30 μL do extrato foram misturados com 3 mL da solução etanólica de ABTS^{•+} e homogeneizados em vórtex. A absorbância foi medida a 734 nm em espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu, Corporation, Kyoto, Japão) após 6 minutos da adição do radical e o etanol 95% v/v foi usado como branco da análise. A capacidade antioxidante do extrato foi calculada por equivalência ao Trolox, usado como padrão na curva de calibração com concentrações de 100 a 2000 μmol ($y = 0,0003x - 0,0008$; $R^2=0,9938$). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em μmol de ET (equivalente ao Trolox) por L de extrato de uva.

2.3.6 Identificação e quantificação das antocianinas monoméricas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

A análise cromatográfica das antocianinas presentes no extrato foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Santiago *et al.* (2010) em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Waters[®] Alliance modelo 2690/5, equipado com detector de arranjo de fotodiodos Waters[®] modelo 2996 (Waters, Milford, MA, USA), com varredura do espectro UV-Vis na faixa de 210 a 600 nm e quantificação em 520 nm. Uma coluna de fase reversa Thermo BDS Hypersil C₁₈ (100×4,6 mm; 2,4 μm) foi usada para a separação das antocianinas. As antocianinas foram eluídas em gradiente de eluição com ácido fórmico 5% em metanol e acetonitrila, com fluxo de 1,0 mL/min e o tempo de corrida foi de 35 minutos. A fase A utilizada consistia em ácido fórmico (5%) e metanol (95%), e a fase B apenas acetonitrila (100%). O gradiente utilizado de fase A foi 0 min (95%), 2 min (93%), 10 min (90%), 15 min (87%), 16 min (85%), 20 min (83%), 30 min (80%), 33 min (95%), 35 min (95%). A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C e o volume de injeção foi 20 μL . As antocianinas foram identificadas por comparação dos tempos de retenção e os espectros UV/Vis com os de amostras e padrões já injetados no laboratório. A quantificação das antocianinas foi realizada utilizando a curva analítica da malvidina-3-*O*-glicosídeo, antocianina majoritária na amostra. Os resultados foram expressos em mg de malvidina-3-*O*-glicosídeo equivalentes por L de extrato de casca de uva.

2.3.7 Identificação e quantificação de ácidos fenólicos e flavanóis por CLAE-DAD

A análise de ácidos fenólicos e flavanóis foi aplicada para a caracterização do extrato líquido concentrado de casca de uva. Por se tratar de extratos livres de sólidos, não foi realizada a etapa de hidrólise. A análise cromatográfica foi realizada de acordo a metodologia descrita por Nascimento *et al.* (2017), 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 × 4,6 mm e 2,4 μm) a 40 °C, em modo de eluição por gradiente usando uma solução aquosa de ácido fosfórico (95%) e acetonitrila (5%), com fluxo de 1 mL.min⁻¹, volume de injeção de 10 μL e tempo de corrida de 30 minutos. Aos 12 minutos da corrida cromatográfica a concentração de acetonitrila foi incrementada para 12%, aos 18 minutos para 20% e aos 20 minutos para 50% de acetonitrila. A concentração de acetonitrila foi mantida em 50% até os 25 minutos e nos minutos finais retornou à condição inicial (5%). A quantificação foi realizada por padronização externa através da construção de curvas analíticas a partir de padrões analíticos comerciais. Os resultados foram expressos em mg de composto por L de extrato de casca de uva.

2.4 Estabilidade do extrato líquido concentrado de casca de uva

2.4.1 Estabilidade do extrato sob temperaturas elevadas. Análise termogravimétrica

Os testes termogravimétricos foram realizados em um analisador automático TGA-2000 (Las Navas Instruments, México). As amostras (~0,5 g) foram aquecidas a partir da temperatura ambiente (aproximadamente 30 °C) até 300 °C a velocidade constante de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio (com velocidade de fluxo de 30 mL/min). As curvas termogravimétricas (TG) mostram a perda de massa da amostra em função da temperatura e as curvas da primeira derivada (DTG) mostram a velocidade da perda de massa da amostra com a temperatura. As curvas da primeira derivada foram utilizadas para identificar as temperaturas nas quais acontece a máxima degradação térmica dos componentes do extrato. As análises foram realizadas em triplicata.

2.4.2 Estabilidade do extrato armazenado a baixas temperaturas

O extrato líquido concentrado de casca de uva (50 mL) foi armazenado em recipientes fechados envoltos em papel alumínio para evitar a ação direta da luz, a -18 °C e a 5 °C durante 60 dias. Para avaliar a estabilidade, foram realizadas análises da cor instrumental e determinação do teor de antocianinas monoméricas pelo método do pH diferencial nos tempos 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias da estocagem.

2.4.2.1 Análise instrumental da cor

A cor do extrato líquido concentrado foi avaliada por reflectância em um colorímetro HunterLab ColorQuest XE (Reston, Virginia, EUA), com abertura de 25 mm de diâmetro e operando com iluminante D65 e ângulo de observação de 10°. O extrato foi colocado em uma cubeta de quartzo de 10 mm e foi realizada a leitura dos parâmetros de cor usando as escalas CIELab e CIELCh. As medidas de cor foram expressas em termos da luminosidade L^* ($L^* = 0$ preto e $L^* = 100$ branco) e das coordenadas a^* ($+a^*$ = vermelho e $-a^*$ = verde) e b^* ($+b^*$ = amarelo e $-b^*$ = azul). A partir de a^* e b^* , foram calculadas as coordenadas cilíndricas C_{ab}^* e h_{ab} de acordo com as seguintes equações $C_{ab}^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ e $h_{ab} = \arctan(b^*/a^*)$. C_{ab}^* (croma) é um atributo quantitativo que define a intensidade ou saturação da cor, enquanto que h_{ab} é o ângulo de tom que define qualitativamente a tonalidade da cor (Clydesdale e Ahmed, 1978; Sant'anna *et al.*, 2013).

2.4.2.2 Cinética de degradação de antocianinas monoméricas durante a estocagem

A estabilidade das antocianinas monoméricas durante o armazenamento foi estudada a -18 e 5 °C durante 60 dias. A mudança na concentração das antocianinas monoméricas no extrato concentrado de casca de uva foi monitorada através do estudo da cinética da reação de degradação. Trabalhos anteriores (Kirca *et al.*, 2006; Wang e Xu, 2007; Hernández-Herrero e Frutos, 2014; Wang *et al.*, 2015) mostraram que a degradação das antocianinas em sucos e concentrados de frutas costuma seguir uma cinética de primeira ordem segundo a equação

$$\frac{dC}{dt} = -kC,$$

onde C representa a concentração de antocianinas monoméricas, k é a constante da velocidade da reação e t é o tempo em dias. Nas cinéticas de primeira ordem, a concentração decresce de maneira exponencial com o tempo, e essa tendência pode ser representada como

$$\ln C/C_0 = -kt,$$

onde C_0 é a concentração inicial de antocianinas monoméricas.

Para o cálculo da constante da velocidade da reação, a variação de $\ln C/C_0$ em função do tempo foi representada graficamente (linha reta). A equação da curva foi obtida aplicando uma análise de regressão linear, onde k é igual ao valor modular da inclinação da reta. Uma vez obtido o valor de k , foi determinado o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) das antocianinas monoméricas do extrato como o tempo no qual a concentração dos pigmentos presentes no extrato concentrado de casca de uva caiu pela metade. Conforme o modelo da cinética de primeira ordem, o valor de $t_{1/2}$ foi calculado como

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}.$$

2.5 Atividade antimicrobiana *in vitro*

2.5.1 Microrganismos e condições de cultivo

A atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato líquido concentrado de casca de uva foi avaliada contra a bactéria Gram positiva, *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 e as bactérias Gram negativas, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028 e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis ATCC 13076. Todas foram armazenadas em ágar tryptona de soja (TSA) a 4 °C, resuspensas em caldo de infusão cérebro e coração (*Brain and Heart Infusion* - BHI) e incubadas a 37 °C por 18h.

2.5.2 Agentes antimicrobianos

Foram testados o extrato líquido concentrado de casca de uva (sem etanol) e várias soluções hidroetanólicas do extrato, preparadas no momento do teste, por diluição em etanol absoluto 99,5% (Merck®, Alemanha) até concentração final 5, 10, 25 e 50% (v/v).

2.5.3 Teste de difusão em poços

O teste de difusão em poços (Harris *et al.*, 1989) foi utilizado para determinar qualitativamente a atividade antimicrobiana. Cada solução testada foi depositada em poços (6

mm) em agar TSBA (caldo tripton de soja com 1% de agar) (OXOID[®], Oxoid, Hampshire, UK) inoculado com uma suspensão de 10^2 UFC/mL de cada microrganismo. Os poços foram preenchidos com 100 μ L do extrato concentrado e de cada diluição. O etanol absoluto 99,5% (Merck[®], Alemanha) foi usado como controle. O halo de inibição foi observado após incubação a 37 °C durante 24 horas. Foi definido como resultado positivo a formação de halos de inibição ≥ 9 mm de diâmetro ao redor dos poços, indicando a presença de substâncias ou grupo de substâncias com propriedades antimicrobianas no extrato testado (Oliveira *et al.*, 2013).

2.6 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados reportados como média \pm desvio padrão. Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) para avaliar a influência da temperatura e o tempo de estocagem nos parâmetros da cor do extrato. Foram realizados os testes de Tukey e *t* de Student para comparação entre as médias. A análise de variância (ANOVA) e o teste Tukey foram usados para avaliar a atividade antimicrobiana do extrato contra diferentes bactérias patogênicas. Todas as análises foram realizadas usando o programa *Statistica* 10.0 (StatSoft, Tulsa, EUA). As diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização do extrato líquido concentrado de casca de uva

A Tabela 1 lista algumas características físico-químicas do extrato obtido nas condições de extração selecionadas. Por se tratar de um extrato líquido, o teor de umidade do extrato foi elevado como esperado (93,5%). Carvalho (2017) reportaram teores de umidade similares (97,4%) para um extrato líquido concentrado de juçara obtido por extração com solução 50% água/etanol com ácido cítrico. Nesse mesmo estudo, o teor de cinzas do extrato líquido concentrado de juçara foi de 0,09%, valor menor que o reportado para o extrato de casca de uva (0,14%) no presente trabalho. De acordo com a literatura, teor de cinzas é referente ao teor de minerais nos frutos, por exemplo, o teor de cinzas nas cascas de uvas é de 2% a 8% (Spigno *et al.*, 2017), o que poderia justificar que a concentração desse componente seja menor no extrato líquido obtido a partir do bagaço de uva, devido à sua migração para o vinho durante a vinificação.

O teor de sólidos solúveis (°Brix) no extrato líquido foi de 13,19%. O teor de sólidos solúveis está relacionado com o teor de açúcares solúveis totais das uvas, que no processo de vinificação são convertidos em etanol pela ação das leveduras durante a fermentação do mosto. Por outro lado, a acidez total foi expressa em função do ácido tartárico, que é o ácido majoritário nas uvas, vinhos e subprodutos da vinificação. A acidez total do extrato foi de 4,62 g de ácido tartárico.100 mL⁻¹. Ribeiro *et al.* (2018) reportaram que a acidez é influenciada pela variedade de uva, condições de cultivo e também pelos diferentes processos de vinificação utilizados. É importante salientar que, neste estudo, para extração a partir das cascas do bagaço de uva foi adicionado ácido cítrico, o qual contribuiu para a elevada acidez total e o baixo pH (2,91) encontrados no extrato. A densidade do extrato a 20 °C (1 g.mL⁻¹), próxima à densidade da água (0,99 g.mL⁻¹) na mesma temperatura, o que pode indicar que, apesar de que uma pequena quantidade de etanol fica na solução quando se realiza um único estágio de concentração, a maior parte do etanol foi evaporado e obteve-se um extrato que poderia ser usado em alimentos.

As características do extrato dependem das características do bagaço utilizado como matéria prima, que por sua vez, depende tanto da variedade das uvas quanto das técnicas de vinificação a que foram submetidas para a elaboração do vinho (Ky *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2018). Em particular, o teor de compostos bioativos e a capacidade antioxidante dos extratos variam entre os estudos publicados na literatura e dependem de diferentes fatores como a fração do subproduto avaliada (bagaço integral, cascas, sementes), método de extração utilizado, razão sólido/líquido, solventes, acidificação da solução de extração, temperatura e tempo da extração.

A cor constitui a primeira característica sensorial que os consumidores apreciam nos alimentos, sendo relacionada ao sabor e ao mesmo tempo constitui uma estimativa da qualidade global do alimento (Pathare *et al.*, 2013). Como ilustra a Tabela 1, o valor obtido para o parâmetro L^* foi bastante baixo ($26,31 \pm 0,12$), o que significa que o extrato apresentou uma cor muito escura. Valores de L^* similares foram reportados por Figueiredo-González *et al.* (2013) em vinho naturalmente doce ($26,2 \pm 0,06$) e vinho base seco ($29,0 \pm 0,17$) a partir desta mesma variedade. Os autores atribuíram esse resultado à degradação de antocianinas monoméricas durante a elaboração do vinho.

Tabela 1 Características físico-químicas, teor de compostos bioativos e atividade antioxidante do extrato líquido concentrado de casca de uva

Parâmetros	Resultados	
Umidade (g/100 g extrato)	$93,50 \pm 0,01$	
Cinzas (g/100 g extrato)	$0,14 \pm 0,00$	
^a % SST (°Brix)	$13,19 \pm 0,71$	
^b AT (g ácido tartárico/100 mL extrato)	$4,62 \pm 0,10$	
pH	$2,91 \pm 0,02$	
Densidade a 20 °C (g/mL extrato)	$1,00 \pm 0,003$	
^c AM (mg Mv-3-O-glc/L extrato)	$270,02 \pm 8,66$	
^d CFT (mg EAG/L extrato)	$4801,80 \pm 169,96$	
^e ORAC ($\mu\text{mol Trolox/L}$ extrato)	$36982,01 \pm 798,54$	
^f ABTS ^{•+} ($\mu\text{mol Trolox/L}$ extrato)	$23905,19 \pm 1819,28$	
Cor	^g L^*	$26,31 \pm 0,12$
	^h a^*	$2,25 \pm 0,05$
	ⁱ b^*	$-0,32 \pm 0,01$
	^j C_{ab}^*	$2,27 \pm 0,05$
	^k h_{ab}	$352,05 \pm 0,34$

Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n = 3$).

^a % SST: Sólidos solúveis totais; ^b AT: Acidez total

^c AM: Antocianinas monoméricas, Mv3gl: malvidina-3-O-glicosídeo.

^d CFT : Compostos fenólicos totais, EAG: equivalentes ao ácido gálico.

^e ORAC: Capacidade de absorvência do radical oxigênio.

^f ABTS^{•+}: Atividade sequestradora do radical catiônico.

^g L^* : Luminosidade ($L^* = 0$ preto e $L^* = 100$ branco)

^h a^* : ($+a^* =$ vermelho e $-a^* =$ verde); ⁱ b^* : ($+b^* =$ amarelo e $-b^* =$ azul)

^j C_{ab}^* : Croma ou saturação da cor; ^k h_{ab} : Ângulo de tom

O valor positivo de a^* ($2,25 \pm 0,05$), negativo de b^* ($-0,32 \pm 0,01$) e o elevado valor de h_{ab} ($352,05 \pm 0,34$, próximo a 360°) sugerem que a cor do extrato se encontra no IV quadrante do espaço de cor e, portanto, apresenta uma tonalidade roxa avermelhada escura. Por outro lado, o baixo valor obtido para o parâmetro C_{ab}^* ($2,27 \pm 0,05$) sugere que a cor do extrato é opaca ou sem brilho. Wyler et al. (2007) encontraram resultados similares ao caracterizar, por análise sensorial, um vinho elaborado a partir de uvas da cultivar Alicante Bouschet, também cultivada nas condições do clima tropical semiárido do Vale do Submédio do São Francisco. Os avaliadores caracterizaram o vinho como vermelho-violeta, intenso e opaco.

Segundo Castillo-Muñoz *et al.* (2009), a intensa cor vermelho-violeta dos vinhos jovens elaborados a partir da variedade Garnacha Tintoreira está muito relacionada com a sua composição, principalmente a presença e concentração das diferentes antocianinas. Também podem ocorrer reações de co-pigmentação entre as antocianinas e também com outros compostos fenólicos como os flavonóis e os ácidos hidroxicinâmicos dando lugar a outros pigmentos responsáveis pela intensidade da cor dos vinhos tintos jovens desta cultivar. Da mesma forma, a concentração e os tipos de antocianinas e as possíveis reações com outros compostos fenólicos presentes influenciam na expressão da cor do extrato líquido concentrado de casca de uva.

3.2 Identificação e quantificação das antocianinas monoméricas por CLAE-DAD

Dentre os compostos fenólicos, as antocianinas são os principais polifenóis presentes nas uvas frescas inteiras. Nas variedades tintas como a Alicante Bouschet ou Garnacha Tintoreira, as antocianinas podem estar presentes tanto na casca como na polpa e são responsáveis pela cor vermelha das uvas e vinhos tintos (Castillo-Muñoz *et al.*, 2009; Falginella *et al.*, 2012; Figueiredo-González *et al.*, 2013).

No extrato de casca de uva Alicante Bouschet foram identificadas as cinco antocianinas monoglicosiladas como ilustra a Figura 1: delphinidina-3-*O*-glicosídeo, cianidina-3-*O*-glicosídeo, petunidina-3-*O*-glicosídeo, peonidina-3-*O*-glicosídeo e malvidina-3-*O*-glicosídeo. As substâncias equivalentes aos picos 6 ao 22 e 25 ao 27 (Figura 1) também foram identificadas como antocianinas por apresentar espectros de UV/Visível característicos destes pigmentos ($\lambda_{m\acute{a}x} = 520$ nm), mas não foi possível a identificação individual devido à ausência de padrões analíticos. As áreas desses picos não foram quantificadas individualmente pois apresentaram sinal com magnitude muito baixa e/ou baixa resolução, portanto suas áreas foram somadas para realização da quantificação. Também foram detectados dois picos de elevada magnitude (picos 23 e 24), que apresentaram espectros UV-Vis característicos de derivados acilados das antocianinas peonidina e malvidina, respectivamente.

Para fins de comparação e tentativa de identificação desses picos, o extrato foi injetado nas mesmas condições cromatográficas que o método descrito por Figueiredo-González *et al.* (2014) (resultados não mostrados). Os resultados mostraram um perfil cromatográfico similar ao reportado previamente pelos autores, que examinaram o perfil de antocianinas em três vinhos tintos a partir da uva Garnacha Tintoreira. As antocianinas correspondentes aos picos 23 e 24 também foram identificadas por Mazza (2017) mediante análise de espectrometria de massas no extrato de bagaço de uva Syrah. A partir da comparação desses resultados com o perfil obtido para o extrato de uva Alicante Bouschet, os picos 23 e 24 poderiam ser tentativamente designados como: peonidina-3-*O*-(6-*O*-*p*-cumaroil)-glicosídeo e malvidina-3-*O*-(6-*O*-*p*-cumaroil)-glicosídeo. De acordo com os resultados obtidos por Ky *et al.* (2014), alguns dos picos do 6 ao 22, poderiam corresponder a antocianinas aciladas com ácido acético e ácido *p*-

cumárico, que são menos extraídas das uvas para o vinho durante o processo de vinificação, permanecendo retidas no bagaço.

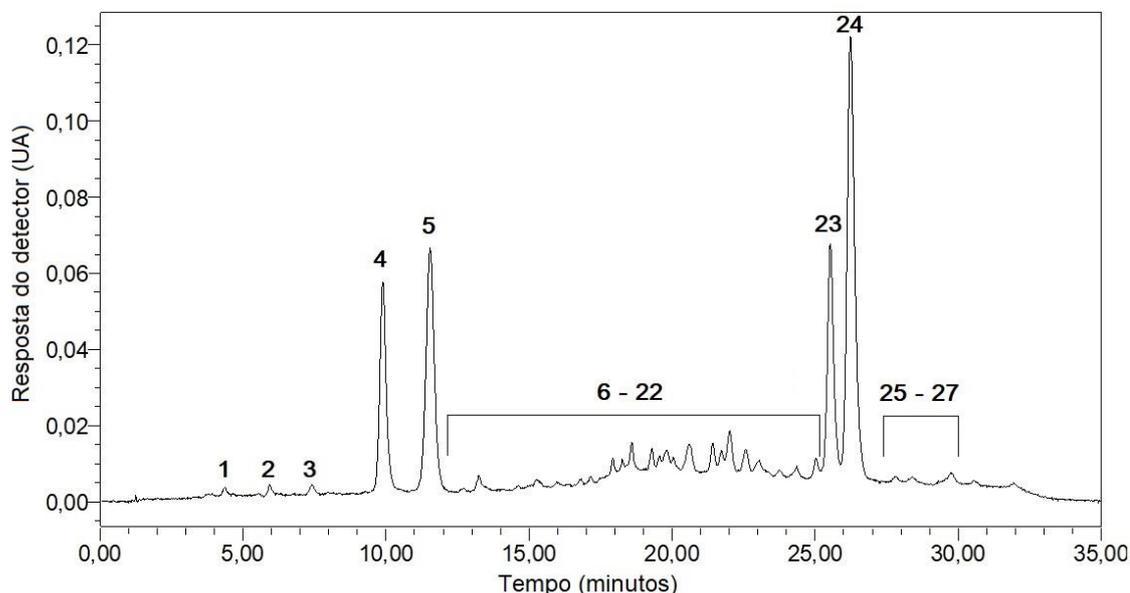


Figura 1. Cromatograma a 520 nm mostrando as antocianinas detectadas extrato líquido concentrado de casca de uva. (1) delphinidina-3-*O*-glicosídeo, (2) cianidina-3-*O*-glicosídeo, (3) petunidina-3-*O*-glicosídeo, (4) peonidina-3-*O*-glicosídeo, (5) malvidina-3-*O*-glicosídeo, (6-22) Não identificadas, (23) peonidina-3-*O*-(6-*O*-*p*-cumaroil)-glicosídeo, (24) malvidina-3-*O*-(6-*O*-*p*-cumaroil)-glicosídeo, (25-27) Não identificadas.

A Tabela 2 lista a quantificação das antocianinas monoméricas presentes no extrato da casca de uva Alicante Bouschet. O teor de antocianinas monoméricas totais quantificado por CLAE-DAD foi de 395,7 mg.L⁻¹ de extrato concentrado de casca de uva. Este resultado foi similar ao encontrado por Figueiredo-González *et al.* (2014) ao avaliar um vinho tinto a partir da mesma variedade de uva (390 mg. L⁻¹). Isto sugere que o resíduo (casca de uva e polpa remanescente) utilizado para obtenção do extrato possui uma elevada concentração de antocianinas, devido à incompleta extração desses compostos durante a produção do vinho. Além disso, o uso de etanol como solvente facilitou a extração das antocianinas detectadas no extrato. Tem sido relatado que a elevada concentração de antocianinas monoméricas, na forma do cátion *flavilium*, está relacionada com a cor vermelha dos vinhos jovens (Torchio *et al.*, 2011; He *et al.*, 2012; Figueiredo-González *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2017), e também pode ser responsável pela cor dos extratos obtidos a partir dos resíduos da vinificação.

As antocianinas mais abundantes no extrato foram as derivadas da malvidina, representando 53,8% do total de antocianinas. A malvidina-3-*O*-(6-*O*-*p*-cumaroil)-glicosídeo foi a principal antocianina (128,60 mg.L⁻¹ de extrato), seguida da malvidina-3-*O*-glicosídeo (84,30 mg.L⁻¹ de extrato). Os derivados da peonidina foram o segundo grupo de antocianinas em maior concentração, sendo 28,2% do total de antocianinas presentes no extrato. A peonidina-3-*O*-glicosídeo foi a terceira antocianina mais abundante (59,10 mg.L⁻¹ de extrato), seguida da peonidina-3-*O*-(6-*O*-*p*-cumaroil)-glicosídeo (52,40 mg.L⁻¹ de extrato). As antocianinas monoglicosiladas delphinidina-3-*O*-glicosídeo, cianidina-3-*O*-glicosídeo, petunidina-3-*O*-glicosídeo representaram entre 0,25 e 0,60% do total de antocianinas quantificadas. Resultados similares foram obtidos por Castillo-Muñoz *et al.* (2009), ao estudarem o perfil de antocianinas monoméricas em uvas e vinhos da cultivar Garnacha

Tintoreira. Os autores reportaram que os derivados da malvidina e da peonidina predominaram nas cascas e que as polpas das uvas contêm principalmente a peonidina-3-*O*-glicosídeo. Por sua vez, Figueiredo-González *et al.* (2014) reportaram os derivados cumaroil-glicosídicos de malvidina e peonidina como as antocianinas aciladas em maior concentração presentes no vinho jovem obtido a partir desta cultivar. Figueiredo-González *et al.* (2012) também estudaram o perfil de antocianinas por CLAE-DAD a partir de extratos da casca e polpa de três variedades de uva tinta (Mouratón, Gran Negro e Brancellao). As antocianinas encontradas em maior concentração nas variedades Mouratón e Gran Negro também foram a malvidina-3-*O*-glicosídeo e a malvidina-3-*O*-(6-*O*-*p*-cumaroil)-glicosídeo, provavelmente devido ao fato de que ambas procedem, como a Garnacha Tintorera, da cultivar tintoreira Petit Bouschet.

Tabela 2 Teores de antocianinas monoméricas no extrato líquido concentrado de casca de uva

Antocianinas	Tempo de retenção (min)	λ máx (nm)	Concentração (mg.L ⁻¹)
Delfinidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	4,5	520,1	1,0 ± 0,0
Cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	6,0	521,4	2,4 ± 0,0
Petunidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	7,1	522,6	2,2 ± 0,0
Peonidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	10,0	516,5	59,1 ± 2,1
Malvidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	11,7	526,2	84,3 ± 2,7
Σ Picos 6 ao 22			61,5 ± 0,4
Peonidina 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroil) glicosídeo	25,7	526,2	52,4 ± 1,7
Malvidina 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroil) glicosídeo	26,4	533,6	128,6 ± 5,1
Σ Picos 25 ao 27			4,2 ± 0,00
Total Antocianinas			395,7

Valores expressos como média ± desvio padrão ($n = 3$). Identificação: comparação dos tempos de retenção e os espectros de absorção UV–VIS com padrões analíticos disponíveis e por comparação com dados da literatura. Picos 6 ao 22, picos 25 ao 27: não foram identificados individualmente por carecer de padrões analíticos, porém foram somados para a quantificação total. Quantificação: por curva de calibração da malvidina-3-*O*-glicosídeo (padrão analítico puro)

Ky *et al.* (2014), ao comparar uvas frescas e a casca dos bagaços após a vinificação de diferentes variedades de uvas cultivadas na França, reportaram um aumento das antocianinas *p*-coumariladas e uma diminuição das antocianinas acetiladas no bagaço. Esse fenômeno também foi observado em um estudo anterior por García-Beneytez *et al.* (2002). Os autores acharam uma maior concentração de antocianinas coumariladas derivadas da malvidina e da peonidina no bagaço em comparação com as uvas frescas, porém uma menor concentração no vinho. As antocianinas *p*-coumariladas são extraídas das cascas das uvas durante o processo de vinificação de forma mais lenta que as outras antocianinas aciladas, o que poderia explicar a presença de concentrações similares nas cascas de uvas frescas e nas cascas dos bagaços (Ky *et al.*, 2014). Os resultados encontrados neste estudo concordam com esses resultados, pois as

antocianinas aciladas derivadas da malvidina e da peonidina foram encontradas em maior concentração no extrato obtido a partir das cascas do bagaço.

Outro estudo, realizado por Revilla *et al.* (2016), avaliou a composição fenólica e a cor de vários vinhos jovens elaborados a partir de uvas da cultivar Alicante Bouschet cultivadas na Espanha. Os autores reportaram que a malvidina-3-*O*-glicosídeo foi a antocianina mais abundante nos vinhos estudados (43–54%), seguida da peonidina-3-*O*-glicosídeo (18–31%). Quanto às antocianinas aciladas, houve um predomínio das antocianinas aciladas com ácido-*p*-cumárico (9–11%), principalmente as derivadas da malvidina-3-*O*-glicosídeo, que foram detectadas em maior concentração em todos os vinhos avaliados. Os autores concluíram que a intensa cor dos vinhos desta cultivar está associada à elevada concentração de antocianinas e taninos. Estes últimos participam em reações de copigmentação com as antocianinas contribuindo para a intensidade da cor dos vinhos.

Recentemente, Favre *et al.* (2019) estudaram a extração das antocianinas das cascas de uvas, dos vinhos e dos bagaços de diferentes variedades de uvas *Vitis vinifera* L. (Syrah, Marselan e Tannat) cultivadas no Uruguai. Os autores reportaram que a extração dos pigmentos depende do padrão de substituição do anel B da antocianina e do perfil de acilação. As antocianinas di-metoxiladas (ex. malvidina-3-*O*-glicosídeo) foram encontradas em maior concentração no bagaço e no vinho e em menor concentração nas cascas das uvas frescas, o que indica que foram menos extraídas durante a vinificação, porém foram mais estáveis, uma vez extraídas. Por outro lado, as antocianinas *p*-coumariladas foram pouco extraídas das uvas (19%) para o vinho (5%) e permaneceram em maior proporção no bagaço (37%). Os autores comprovaram que as antocianinas metoxiladas e aciladas que permanecem retidas no bagaço são particularmente estáveis.

Os resultados obtidos estão em concordância com os estudos anteriores e sugerem que o extrato avaliado neste estudo, embora tenha sido obtido a partir de subprodutos da vinificação, ainda contém as antocianinas referidas como marcadores para identificação da cultivar Alicante Bouschet. Essas antocianinas parcialmente retidas no bagaço após a vinificação, e sua interação com outros compostos fenólicos presentes no bagaço, contribuem para as propriedades dos extratos, principalmente em relação à cor e a estabilidade, de forma similar ao que acontece com os vinhos.

3.3 Identificação e quantificação de ácidos fenólicos e flavanóis por CLAE-DAD

As Figuras 2 e 3 apresentam os cromatogramas dos ácidos fenólicos e flavanóis presentes no extrato líquido concentrado de casca de uva, obtidos a 270 nm e 370 nm, respectivamente. A comparação com os tempos de retenção e os espectros UV-Vis de padrões comerciais disponíveis possibilitou a identificação e quantificação de sete compostos fenólicos, apresentados na Tabela 3. Dentre os cinco ácidos fenólicos identificados, o ácido vanílico foi encontrado em maior concentração (44,57 mg.L⁻¹) no extrato de casca de uva. O ácido gálico (11,80 mg.L⁻¹) e o ácido siríngico (11,60 mg.L⁻¹) apresentaram concentrações similares no extrato. Por outro lado, o ácido protocatecuico (5,77 mg.L⁻¹) e o ácido elágico (2,00 mg.L⁻¹) foram detectados em baixas concentrações.

Os flavanóis identificados no extrato foram a (+)-catequina (38,80 mg.L⁻¹) e a (–)-epicatequina (23,87 mg.L⁻¹). Concentrações similares desses monômeros foram quantificadas por Figueiredo-González *et al.* (2014) em vinho de base jovem a partir da mesma variedade de uva. Esses autores também detectaram, em baixas concentrações, outro grupo de compostos no vinho jovem, os flavonóis. Estes compostos não foram detectados no extrato concentrado de casca de uva, o que pode ser devido ao fato de participarem em reações de co-

pigmentação com as antocianinas formando outros compostos (Boulton, 2001). Esses novos pigmentos contribuem para a intensa cor dos vinhos (Castillo-Muñoz *et al.*, 2009) e também poderiam estar presentes no extrato concentrado.

A análise por CLAE-DAD revelou que, embora uma parte dos compostos fenólicos sejam extraídos das uvas frescas para o vinho durante o processo de vinificação, o extrato obtido a partir da casca do bagaço de uva ainda contém quantidades apreciáveis de antocianinas, ácidos fenólicos e flavanóis, que ficaram retidos no bagaço. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Ky *et al.* (2014) ao estudar os compostos fenólicos das uvas frescas e dos subprodutos da vinificação da cv. Alicante Bouschet cultivadas no Vale do Ródano na França. As similaridades entre esses estudos permitem concluir que embora a cv. Alicante Bouschet seja de origem francesa, tem sido bem adaptada as condições do clima semiárido do nordeste do Brasil e mantém, de forma geral, o seu perfil fenólico característico.

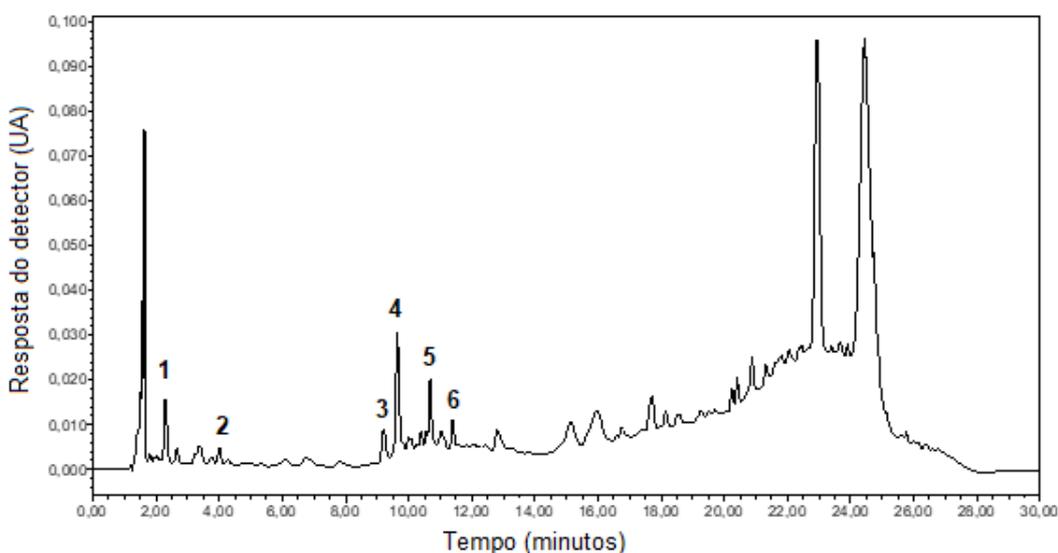


Figura 2 Cromatograma da fração de ácidos fenólicos e flavanóis do extrato líquido concentrado de casca de uva, em 270 nm. (1) ácido gálico, (2) ácido protocatecuico, (3) (+)catequina, (4) ácido vanílico, (5) ácido siríngico, (6) (-)epicatequina

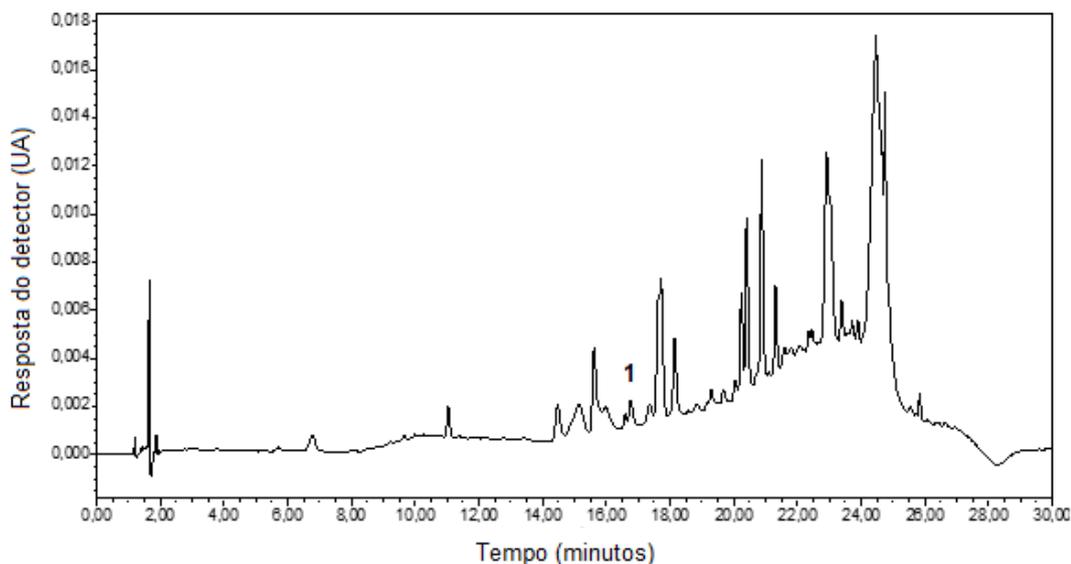


Figura 3 Cromatograma da fração de ácidos fenólicos e flavanóis do extrato líquido concentrado de casca de uva, em 370 nm. (1) ácido elágico

Tabela 3 Ácidos fenólicos e flavanóis identificados no extrato líquido concentrado de casca de uva

Composto fenólico	Tempo de retenção (min)	λ máx (nm)	Concentração (mg.L ⁻¹)
Ácidos fenólicos			
Ácido gálico	2,3	270,3	11,8 ± 0,2
Ácido protocatecuico	4,0	294,1	5,8 ± 0,2
Ácido vanílico	9,6	260,8	44,6 ± 1,8
Ácido siríngico	10,7	273,8	11,6 ± 0,1
Ácido elágico	16,7	364,4	2,0 ± 0,1
Total Ácidos fenólicos			75,7
Flavanóis			
(+)-Catequina	9,2	278,6	38,8 ± 2,9
(-)-Epicatequina	11,3	278,6	23,9 ± 2,0
Total Flavanóis			62,7

Valores expressos como média ± desvio padrão ($n = 3$). Identificação: comparação dos tempos de retenção e os espectros de absorção UV–VIS com padrões analíticos puros e por comparação com dados da literatura. Quantificação: baseada em curvas de calibração a partir de padrões analíticos puros

3.4 Estabilidade do extrato líquido concentrado de casca de uva

3.4.1 Estabilidade térmica. Análise termogravimétrica.

A determinação da estabilidade térmica do extrato é de grande importância pois fornece informação que pode ser útil na definição da temperatura de extração ou de outro processamento térmico que possa ser posteriormente aplicado ao extrato. Essa análise tem sido utilizada para estudar as temperaturas ou faixas de temperaturas características (por exemplo: ponto de fusão, dissociação e decomposição) dos componentes de matrizes alimentares como filmes comestíveis adicionados de extratos de bagaço de uva (Cerruti *et al.*, 2011; Gutiérrez *et al.*, 2018).

A curva termogravimétrica (TG) e a curva termogravimétrica da primeira derivada (DTG) (Figura 4) indicaram dois picos muito pequenos a 78 °C que representam provavelmente as perdas de massa associadas à evaporação do etanol remanescente do extrato. Posteriormente, o extrato apresentou perdas de massa de 4 e 11% (em relação à massa inicial do extrato) nas temperaturas de 98 °C e 125 °C, respectivamente. Essas perdas de massa estão provavelmente associadas com a evaporação da água (ponto de ebulição da água, 100 °C) e também sinalizam a presença do ácido cítrico na mistura etanol/água. Os solutos ocasionam o aumento das forças intermoleculares e diminuem a pressão de vapor da solução o que resulta no aumento da temperatura de ebulição da solução. Posteriormente, se observa outro pico bem definido e de grande intensidade a 152 °C indicando uma perda da massa de 31%, que poderia estar associada ao ponto de fusão do ácido cítrico (153 °C). Finalmente, observa-se uma perda de massa de 91% na temperatura de 191 °C, que se relaciona com a degradação do ácido cítrico, deixando uma massa final residual de 9%. Esses resultados são concordantes com Apelblat (2014) que relatou que durante o aquecimento rápido, o ácido cítrico atinge o ponto de fusão a 153 °C e sua decomposição acontece em temperaturas acima de 175 °C.

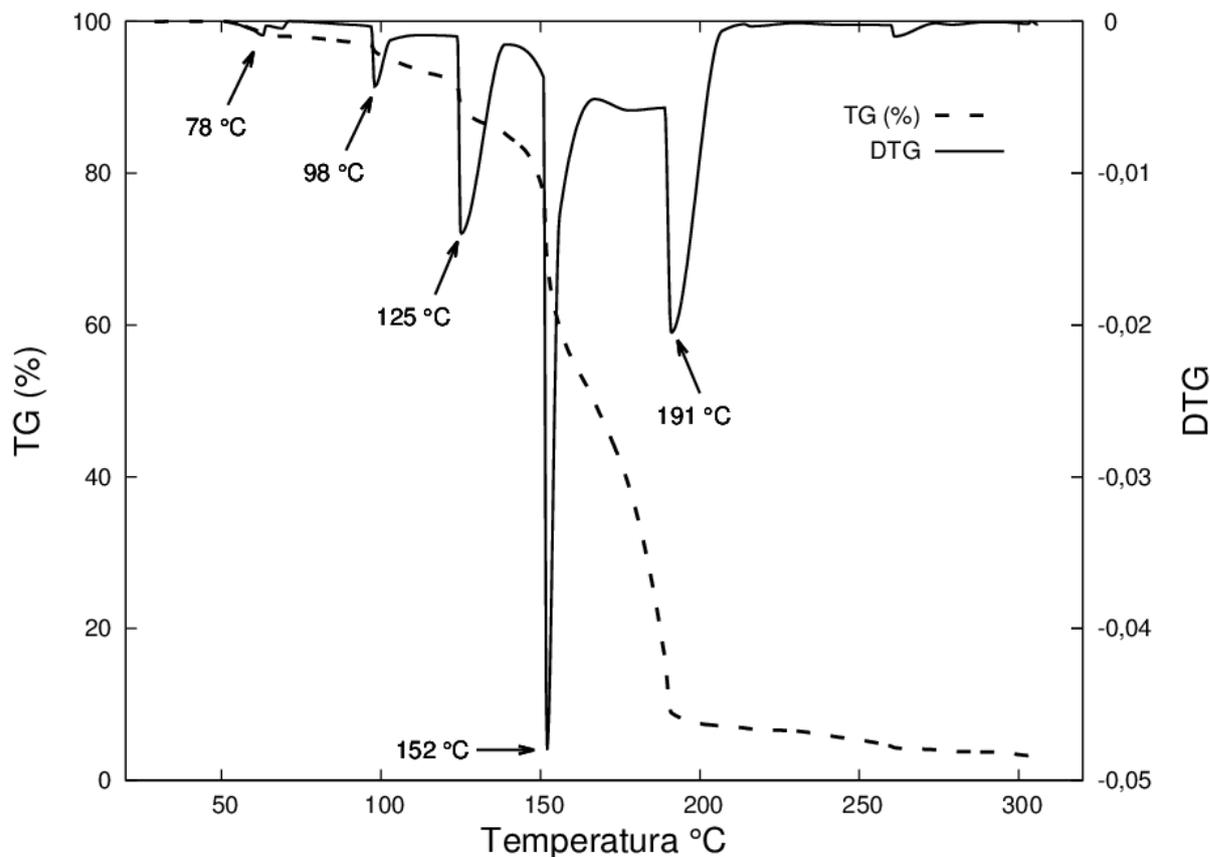


Figura 4 Curva termogravimétrica (TG) (linha pontuada) e curva termogravimétrica da primeira derivada (DTG) do extrato líquido concentrado de casca de uva

Esse comportamento foi observado também por Gutiérrez *et al.* (2018), ao estudarem a degradação térmica do extrato de bagaço de uva adicionado como aditivo em filmes comestíveis preparados à base de amido de tubérculos de *guinea arrowroot* (*Calathea allouia*). Os autores também reportaram perdas de massa a 192 °C e 198 °C no extrato de bagaço de uva e na farinha de bagaço de uva, respectivamente. Esses picos foram relacionados à degradação térmica do ácido cítrico naturalmente presente nestes subprodutos. Foi observado que a intensidade dos picos correspondeu com a concentração do ácido cítrico presente.

Teixeira-Neto *et al.* (2009) avaliaram por análise termogravimétrica um extrato de açaí e reportaram perdas de massa em temperaturas similares às reportadas neste estudo para o extrato concentrado de casca de uva. Os autores relacionaram as perdas de massa na faixa de 100 a 300 °C com a decomposição das antocianinas do extrato de açaí.

Os resultados da análise termogravimétrica mostram que o tratamento térmico afeta a estabilidade dos componentes do extrato concentrado de casca de uva, indicando que 125 °C seria a máxima temperatura admitida para o processamento térmico em relação a estabilidade do ácido cítrico e também para evitar a degradação de antocianinas. A preservação da estabilidade do ácido cítrico no extrato é importante visto que foi adicionado com o objetivo de manter a estabilidade das antocianinas tanto durante a extração a partir da casca de uva quanto durante a estocagem e na posterior aplicação do extrato como corante alimentar.

Porém, vários estudos de extração de antocianinas e outros compostos fenólicos a partir do bagaço de uva têm demonstrado que as temperaturas elevadas, embora aumentem a eficiência da extração destas moléculas a partir da matriz, comprometem a sua estabilidade e

consequentemente a concentração final destes compostos bioativos no extrato. Segundo Cacace e Mazza (2003) as temperaturas de extração na faixa de 55–75 °C podem afetar a estabilidade de compostos fenólicos e antocianinas. Por outro lado, Coelho (2011), ao avaliar a degradação térmica de extratos aquosos da uva finas de mesa da cv. Brasil (clone da cv. Itália) mediante análise termogravimétrica, indicou 85 °C, como a temperatura limite superior para a extração.

Comportamentos similares aos que acontecem nas temperaturas de extração podem ocorrer nos tratamentos térmicos usualmente aplicados na indústria alimentar em relação a degradação das antocianinas. Amendola *et al.* (2010) estudaram a estabilidade de um extrato hidroetanólico obtido a partir do bagaço de uvas tintas cv. Barbera, mediante a simulação de um processo de esterilização. Os autores observaram uma diminuição na absorbância a 520 nm após colocar os extratos (pH 3) em autoclave a 121 °C durante 15 minutos, que está relacionada com a redução do teor de antocianinas monoméricas, pois nesse pH predomina a forma vermelha do cátion *flavilium* que é mais termossensível que as outras formas das antocianinas presentes nos extratos com pH maiores. As condições desse estudo (121 °C, pH 3), que são muito próximas à temperatura indicada como limite para estabilidade, segundo a análise termogravimétrica no presente estudo (125 °C, pH 2,91), poderiam indicar que nessa temperatura pode acontecer degradação de antocianinas comprometendo a estabilidade do extrato.

A composição e estrutura das antocianinas do alimento, especificamente o padrão de substituição no anel B da molécula da antocianina, as interações entre os componentes da matriz alimentar e os parâmetros de processo usados no tratamento térmico são alguns dos fatores que mais influenciam a estabilidade das antocianinas. Hartmann *et al.* (2008) reportaram perdas de 21% da concentração inicial de antocianinas durante a pasteurização (85 °C durante 15 minutos) do suco de morango, porém com um tratamento menos severo (85 °C durante 5 segundos), a perda de antocianinas foi de 9%.

A remoção dos copigmentos durante a clarificação do suco de cenoura preta afetou a estabilidade das antocianinas, resultando em um 16% de perda das antocianinas totais enquanto que no suco sem clarificar, a concentração de antocianinas foi somente 2% menor que a concentração inicial (Türkyilmaz *et al.*, 2012). Por outro lado, White *et al.* (2011) ao avaliar a estabilidade do suco de cranberry, reportaram que a pasteurização (90°C, pH 2,5) quase não afetou a concentração de antocianinas e afirmaram que o baixo pH teve marcada influencia neste comportamento. Isto poderia sugerir que, no presente estudo, as antocianinas presentes poderiam manter a sua estabilidade sob tratamento a elevadas temperaturas devido ao pH baixo do extrato de casca de uva. Porém, estudos posteriores precisam ser realizados para avaliar a temperatura e o tempo máximos aos quais o extrato poderia ser submetido em posteriores aplicações como corante em alimentos. Na avaliação devem considerar-se a estrutura das antocianinas presentes e as possíveis interações com os componentes da matriz onde o extrato seja adicionado.

3.5 Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento na cor do extrato

A cor tem um papel importante na aceitabilidade dos alimentos pelos consumidores. As antocianinas são responsáveis pelas cores atrativas exibidas pelos frutos como a uva e seus derivados. Foram observados valores bastante baixos de L^* (Tabela 4) tanto em temperaturas de congelamento (25,96–26,83) quanto em temperaturas de refrigeração (25,54–26,65) durante o tempo avaliado, o que significa que, de forma geral, o extrato concentrado apresentou uma cor muito escura desde o tempo zero até o final da estocagem. Para todos os parâmetros de cor foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as temperaturas avaliadas no mesmo

tempo, com exceção do tempo 15 dias. Neste tempo, embora tenha acontecido um ligeiro incremento nos parâmetros a^* e C_{ab}^* no extrato armazenado a 5 °C, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) para as leituras dos parâmetros L^* , b^* e h_{ab} entre os extratos armazenados tanto a -18 °C quanto a 5 °C, o que indica que o extrato manteve a mesma tonalidade da cor roxa avermelhada opaca e escura durante todo o tempo de armazenamento.

Tabela 4 Parâmetros de cor para o extrato líquido concentrado de casca de uva no tempo inicial e durante 60 dias de estocagem a -18 °C e 5 °C

Tempo (dias)	T (°C)	Coordenadas de cor				
		L^*	a^*	b^*	C_{ab}^*	h_{ab}
0	-18	A 26,31 ± 0,12 ^b	A 2,25 ± 0,05 ^c	A -0,32 ± 0,01 ^a	A 2,27 ± 0,05 ^c	A 352,05 ± 0,34 ^b
	5	A 26,31 ± 0,12 ^b	A 2,25 ± 0,05 ^{bc}	A -0,32 ± 0,01 ^a	A 2,27 ± 0,05 ^{bc}	A 352,05 ± 0,34 ^c
7	-18	A 26,55 ± 0,02 ^c	A 1,91 ± 0,05 ^a	A -0,09 ± 0,02 ^c	A 1,91 ± 0,05 ^a	A 357,44 ± 0,69 ^d
	5	B 26,29 ± 0,04 ^b	B 2,14 ± 0,07 ^{ab}	B -0,16 ± 0,05 ^b	B 2,15 ± 0,07 ^a	B 355,76 ± 1,13 ^d
15	-18	A 26,63 ± 0,01 ^c	A 1,88 ± 0,04 ^a	A -0,08 ± 0,02 ^c	A 1,88 ± 0,04 ^a	A 357,75 ± 0,50 ^d
	5	A 26,62 ± 0,01 ^b	B 2,16 ± 0,02 ^{ab}	A -0,08 ± 0,03 ^b	B 2,16 ± 0,02 ^{ab}	A 357,89 ± 0,88 ^d
30	-18	A 25,96 ± 0,05 ^a	A 1,84 ± 0,03 ^a	A -0,15 ± 0,01 ^b	A 1,85 ± 0,03 ^a	A 355,24 ± 0,41 ^c
	5	B 25,54 ± 0,03 ^a	B 2,49 ± 0,06 ^d	B 0,13 ± 0,03 ^c	B 2,5 ± 0,06 ^d	B 3,02 ± 0,50 ^a
45	-18	A 26,38 ± 0,01 ^b	A 2,04 ± 0,04 ^b	A -0,15 ± 0,03 ^b	A 2,05 ± 0,04 ^b	A 355,63 ± 0,78 ^c
	5	B 26,65 ± 0,17 ^b	B 2,32 ± 0,04 ^c	B 0,14 ± 0,03 ^c	B 2,32 ± 0,03 ^c	B 3,38 ± 0,75 ^a
60	-18	A 26,83 ± 0,07 ^d	A 2,25 ± 0,06 ^c	A 0,15 ± 0,02 ^d	A 2,25 ± 0,07 ^c	A 3,73 ± 0,55 ^a
	5	B 25,70 ± 0,38 ^a	B 2,05 ± 0,06 ^a	B 0,27 ± 0,09 ^d	B 2,07 ± 0,06 ^a	B 7,52 ± 2,55 ^b

Valores expressos como média ± desvio padrão ($n = 4$). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tempos na mesma temperatura de acordo com o teste Tukey ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as temperaturas no mesmo tempo de acordo com o teste t de Student para amostras não pareadas ($p < 0,05$)

Para melhor compreender o comportamento da cor como uma medida tridimensional, os dados das coordenadas a^* e b^* foram plotados para se encontrar o ângulo de tom ou tonalidade observada no extrato durante a estocagem. A Figura 5 ilustra a distribuição da cor do extrato nos eixos coordenados perpendiculares a^* e b^* na esfera de cor CIELab para os diferentes tempos e temperaturas de armazenamento. Desde o início do estudo até os 45 dias de armazenamento em congelamento e também durante os primeiros 15 dias sob temperaturas de refrigeração foram obtidos valores positivos de a^* (1,84–2,25, na região vermelha do espaço de cor), negativos de b^* (-0,32 a -0,08, na região azul na esfera de cor) e elevados valores de h_{ab} (352,05–357,89, próximos a 360°) (Tabela 4). Estes resultados permitem localizar a cor do extrato concentrado no IV quadrante do espaço de cor que apresenta uma tonalidade roxa avermelhada escura (Voss, 1992; Sant'anna *et al.*, 2013). Valores similares aos obtidos no extrato concentrado no tempo inicial do estudo de estocagem, foram reportados em uvas frescas da cultivar Pinot noir que também tem a casca intensamente colorida, sendo L^* (31,24), a^* (3,25), b^* (-0,01), C_{ab}^* (3,25) e h_{ab} (359,85) (Ferreira *et al.*, 2017).

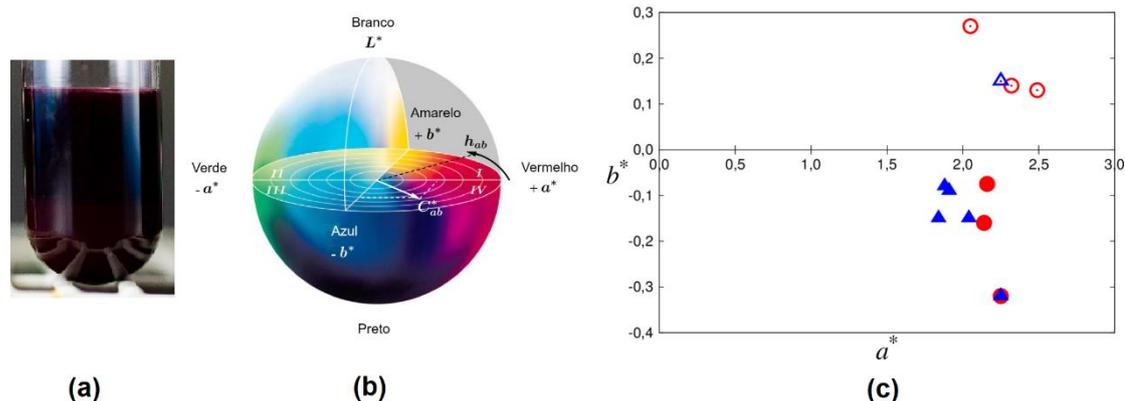


Figura 5 (a) Extrato líquido concentrado de casca de uva no tempo inicial do estudo de estabilidade. Fonte: Sidney Pacheco. (b) Espaço de cor CIELab (Fonte: modificado de www.linocolor.com). (c) Distribuição da cor do extrato durante a estocagem baseada nas coordenadas CIELab: (●) Refrigeração/roxo escuro, (○) Refrigeração/vermelho escuro, (▲) Congelamento/roxo escuro, (△) Congelamento/vermelho escuro

A partir dos 30 dias de armazenamento sob refrigeração e também aos 60 dias sob congelamento, foram observados valores positivos do parâmetro b^* (0,13–0,27) e baixos valores de h_{ab} (3,02–7,52 próximos a 0°) (Tabela 4), que contribuíram para uma mudança na tonalidade do extrato para vermelha escura (I quadrante no espaço de cor).

Não foram observadas diferenças significativas nos valores de a^* ($p > 0,05$) entre o início e o final da estocagem -18°C , o que pode indicar que mudanças no parâmetro b^* (na região azul do espaço de cor) exercem uma maior influência na tonalidade do extrato armazenado em congelamento.

Por outro lado, os baixos valores do parâmetro C_{ab}^* (próximos ao centro no espaço de cor), obtidos para o extrato armazenado tanto em temperaturas de congelamento quanto em temperaturas de refrigeração, sugerem que a cor do extrato se manteve opaca durante o tempo de estocagem avaliado. Para esse parâmetro não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o tempo inicial e final da estocagem a -18°C . Em geral, os resultados indicam que a cor do extrato apresentou maior estabilidade durante o armazenamento em congelamento.

A tonalidade do extrato está relacionada com o conteúdo de antocianinas, pois esses compostos têm sido reconhecidos como os principais contribuintes para a variação da cor nos diferentes cultivares de uvas (Liang *et al.*, 2011). A cor das antocianinas monoméricas depende do número de grupos hidroxila e metoxila presentes na sua estrutura: a presença de mais grupos hidroxila produz cores roxas e azuis, enquanto que a cor vermelha é característica das antocianinas com mais grupos metoxila (Fournier-Level *et al.*, 2011).

Os resultados encontrados neste estudo estão em concordância com os reportados por Han e Xu (2015), que comprovaram que a presença de grupos metoxila substituintes no anel B da molécula da antocianina contribuem para as cores mais escuras exibidas pelas antocianinas em solução hidroalcoólica (12% etanol, pH 3,5). Os autores observaram baixos valores de L^* , valores positivos de a^* (maior intensidade da cor vermelha), valores negativos de b^* e valores de h_{ab} que denotam maior intensidade da cor azul, principalmente nas soluções das antocianinas malvidina-3-*O*-glicosídeo e peonidina-3-*O*-glicosídeo. A tonalidade azul (h_{ab}) exibida pela solução de malvidina-3-*O*-glicosídeo (dois grupos metoxila no anel B) foi mais intensa que para a peonidina-3-*O*-glicosídeo (um grupo metoxila no anel B). No entanto, o valor do C_{ab}^* foi

menor para a malvidina-3-*O*-glicosídeo em comparação à peonidina-3-*O*-glicosídeo, o que indica que a cor da primeira foi mais brilhante.

Assim, no extrato de casca de uva foi encontrada uma maior concentração das antocianinas monoglicosiladas malvidina-3-*O*-glicosídeo e peonidina-3-*O*-glicosídeo e suas derivadas aciladas que possuem dois grupos metoxila e um grupo metoxila, respectivamente, além do grupo hidroxila na sua estrutura. Estes grupos podem ser os principais responsáveis pela tonalidade roxa percebida na cor do extrato junto com a contribuição das outras antocianinas monoglicosiladas (delfinidina-3-*O*-glicosídeo, cianidina-3-*O*-glicosídeo, petunidina-3-*O*-glicosídeo) encontradas em menor concentração. Quanto ao grau de metoxilação, tanto os derivados da malvidina quanto os da peonidina possuem dois e um grupo metoxila na sua estrutura, respectivamente, os quais contribuem para a tonalidade avermelhada observada no extrato. De acordo com He *et al.* (2012), a proporção e concentração das antocianinas monoméricas conferem uma tonalidade vermelho-violeta tanto às uvas quanto aos vinhos jovens.

A cor das antocianinas em meio aquoso é influenciada também pelo pH. O extrato de casca de uva possui um pH baixo (pH = 2,91), onde a forma catiônica (cátion *flavilium*) de cor vermelha pode estar em equilíbrio com a base anidra quinoidal de cor azul devido ao fato de que quando o pH aumenta acima de 2, acontece uma rápida desprotonação que conduz à formação da base anidra quinoidal. Nessas condições existe um balanço entre as cores vermelha e roxa (Brouillard *et al.*, 1978), o que poderia estar contribuindo para a cor roxa avermelhada do extrato. Chris Somers e Evans (1979) atribuíram a cor roxa escura dos sucos de uvas vermelhas obtidas por prensagem a quente aos complexos formados por reações entre o cátion *flavilium* e a base quinoidal, juntamente com outros compostos. Por outro lado, na vinificação, uma vez que se produz o etanol como resultado da fermentação do mosto, a cor muda para vermelho brilhante, devido à ruptura das ligações formadas por copigmentação com outros compostos fenólicos (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006).

Liang *et al.* (2011) estudaram 78 cultivares de uvas, estabelecendo a relação entre a composição de antocianinas e os parâmetros da cor. Os autores relataram que o teor de antocianinas aumentou à medida que a casca das uvas apresentou a cor mais escura. Nas cultivares que apresentaram cores mais escuras (vermelho-preta, vermelho-violeta escuro e azul-preto), as antocianinas mais abundantes foram os derivados da malvidina (monoglicosiladas e aciladas), representando 50% do total de antocianinas. Estes resultados são concordantes com os obtidos neste estudo, onde os derivados da malvidina contribuem para 53,8% do total de antocianinas presentes no extrato obtido a partir da cultivar Alicante Bouschet, reconhecida pela intensa coloração da casca e polpa das uvas.

Segundo Ribereau-Gayon *et al.* (2006), as antocianinas aciladas derivadas da malvidina (ex. malvidina-3-*O*-(6-*O*-*p*-cumaroil)-glicosídeo) são moléculas mais resistentes à oxidação, conferindo maior estabilidade ao vinho. Dessa forma, a elevada concentração desta antocianina acilada no extrato de casca de uva poderia contribuir para a maior estabilidade deste extrato.

Nas antocianinas aciladas, a estabilização da cor deve-se a interações hidrofóbicas que ocorrem entre o grupo acila e o anel pirrólico da antocianina. Essas interações podem acontecer também entre o anel pirrólico e a molécula de outro composto fenólico que esteja atuando como co-pigmento, fazendo com que o cátion *flavilium* seja menos reativo diante da molécula de água (Markakis, 2012). A acilação com ácidos hidroxicinâmicos como o ácido *p*-cumárico não só protege as antocianinas contra a perda de cor, rápida e irreversível provocada pela adição de água, mas também contra a lenta e irreversível perda de cor devido à degradação química, que leva à clivagem do anel C (Moloney *et al.*, 2018).

A presença e elevada concentração destes tipos de antocianinas monoméricas (malvidina-3-*O*-glicosídeo e peonidina-3-*O*-glicosídeo e suas derivadas aciladas) poderia contribuir para a tonalidade vermelho-violeta percebida no extrato concentrado de casca de uva, que se manteve estável até os 45 dias de armazenamento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ e durante 15 dias a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. O fato de que esses tipos de antocianinas sejam as mais estáveis poderia sugerir que, embora tenha acontecido uma mudança de cor, predomina a tonalidade vermelha escura, que favoreceria a sua utilização como corante natural em alimentos.

3.6 Degradação de antocianinas monoméricas durante a estocagem

As antocianinas são pigmentos relativamente instáveis, sendo que sua maior estabilidade ocorre sob condições ácidas. As reações de degradação dessas moléculas começam quando extraídas dos tecidos vegetais, e também durante o processamento e armazenamento dos alimentos. A estabilidade desses compostos é altamente variável e depende principalmente da própria estrutura (os grupos substituintes na aglicona), que também influencia nas características da cor (Schwartz *et al.*, 2010).

Para avaliar o efeito do tempo de estocagem, a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, na degradação das antocianinas monoméricas presentes no extrato líquido concentrado de casca de uva foram testados os modelos cinéticos de ordem zero, primeira e segunda ordem (resultados não mostrados). De acordo com os resultados, o modelo de primeira ordem descreveu satisfatoriamente a reação de degradação das antocianinas monoméricas presentes no extrato de casca de uva armazenado a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ em função do tempo. A tendência descrita pelo gráfico (Figura 6) indica que a concentração das antocianinas monoméricas decresce de maneira exponencial com o tempo durante a estocagem sob temperatura de congelamento. Para a estocagem sob refrigeração ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$), apesar de que a representação gráfica (Figura 6) não mostra dados organizados de forma perfeitamente linear, o modelo cinético de primeira ordem foi selecionado como o modelo linear com melhor ajuste para estimar a degradação das antocianinas segundo o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,8690$), o mais próximo de 1 em comparação com os modelos avaliados.

O valor modular da constante de reação k indica que a velocidade de degradação das antocianinas monoméricas foi mais de duas vezes maior a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($k = 0,0069$) que a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($k = 0,0029$). Ainda que as baixas temperaturas de estocagem sejam usadas para retardar os processos de degradação dos alimentos, os resultados permitem concluir que possíveis reações de oxidação e de polimerização diminuíram o teor de antocianinas monoméricas no extrato. Considerando as equações de regressão obtidas, ao final de 60 dias da estocagem foram observadas retenções de 84% ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) e o 66% ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$) da concentração inicial das antocianinas monoméricas do extrato. O $t_{1/2}$ (tempo em que a concentração é igual à metade da concentração inicial) das antocianinas monoméricas foi de 236,18 e 100,86 dias para as temperaturas de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Esses resultados permitem concluir que, como esperado, a estocagem a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi mais eficiente na conservação do extrato de casca de uva.

Considerando as características do extrato, como o seu pH ácido, e as baixas temperaturas usadas na estocagem, a estabilidade deste extrato depende majoritariamente da estrutura química e da concentração das antocianinas monoméricas, que influenciam nas características da cor. Os grupos hidroxila são os mais sensíveis à oxidação, principalmente os adjacentes à molécula na posição *orto* presentes, por exemplo, na cianidina-3-*O*-glicosídeo e na delfinidina-3-*O*-glicosídeo (He *et al.*, 2012). Estas antocianinas e também a petunidina-3-*O*-glicosídeo, que possui dois grupos hidroxila na sua estrutura, são mais reativas em meio aquoso

e foram encontradas em menor concentração no extrato, portanto poderiam ser as primeiras a sofrerem degradação durante a estocagem.

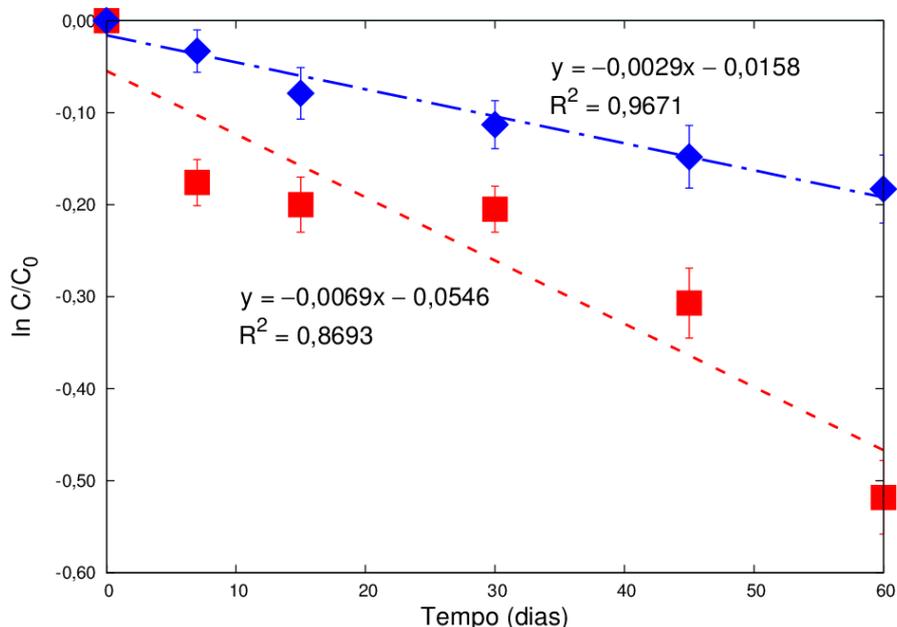


Figura 6 Cinética de degradação das antocianinas monoméricas no extrato de casca de uva a pH 2,91 durante a estocagem a -18 °C (◆) e 5 °C (■). C_0 e C : concentrações de antocianinas monoméricas inicial e em cada tempo avaliado, respectivamente. Valores representados como média \pm desvio padrão

Por outro lado, a malvidina-3-*O*-glicosídeo e a peonidina-3-*O*-glicosídeo possuem grupos metoxilas que estabilizam a molécula, reduzindo a reatividade. A metoxilação também incrementa a solubilidade em água e reforça as propriedades corantes destas antocianinas (Fournier-Level *et al.*, 2011). Isto poderia sugerir que a malvidina-3-*O*-glicosídeo e a peonidina-3-*O*-glicosídeo sejam as antocianinas monoglicosiladas mais estáveis, cuja presença estejam contribuindo para a cor vermelha escura do extrato, ainda que em menores concentrações, no final do tempo de estocagem.

Segundo He *et al.* (2012), a acilação também pode aumentar tanto a estabilidade quanto a solubilidade das antocianinas. No presente estudo, as antocianinas monoaciladas com ácido-*p*-cumárico (malvidina-3-*O*-(6-*O-p*-cumaroil)-glicosídeo e peonidina-3-*O*-(6-*O-p*-cumaroil)-glicosídeo) também poderiam contribuir para a estabilidade do extrato até o final da estocagem levando em consideração a elevada concentração deste tipo de antocianinas ao início do estudo. Revilla *et al.* (2001) observaram um ligeiro incremento da concentração relativa da malvidina-3-*O*-(6-*O-p*-cumaroil)-glicosídeo porém uma ligeira diminuição da concentração relativa da malvidina-3-*O*-glicosídeo durante a estocagem do vinho.

Tem sido reportado que, no vinho, as antocianinas monoméricas sofrem degradação durante a estocagem e se observa uma mudança na tonalidade, pela formação das antocianinas poliméricas que ajudam a manter a cor vermelha do vinho (He *et al.*, 2012). As reações de condensação (auto-associação) entre as antocianinas e as reações de copigmentação com outros fenólicos resultam na formação de outros pigmentos mais estáveis. As piranoantocianinas, por exemplo, se formam como resultado da reação entre as antocianinas com o ácido pirúvico e o acetaldeído (metabólitos intermediários da fermentação), sendo reportadas tanto nos vinhos jovens (Castillo-Muñoz *et al.*, 2009) quanto nos subprodutos da vinificação (Amico *et al.*, 2004;

Barcia *et al.*, 2014). Apesar da menor concentração desses pigmentos no bagaço, em comparação com o vinho, ainda poderiam contribuir para uma maior estabilidade dos extratos e a retenção da cor durante o armazenamento.

Segundo Boulton (2001) e Bimpilas *et al.* (2016), a copigmentação é responsável por mais do 30% da cor dos vinhos tintos jovens, enquanto que durante a estocagem predomina a cor dos pigmentos poliméricos formados entre as antocianinas e outros compostos presentes. As catequinas e as proantocianidinas (combinação de várias unidades monoméricas de (+)catequinas e (-)epicatequinas, seus oligômeros e polímeros), são os principais substratos para a condensação com as antocianinas monoméricas e a consequente evolução para antocianinas poliméricas (Figueiredo-González *et al.*, 2014).

A presença de proantocianidinas no extrato de casca de uva em estudo não deve ser descartada, pois embora não tenham sido quantificados os flavanóis polimerizados ou proantocianidinas, foram detectadas e quantificadas as suas unidades monoméricas: (+)catequina e (-)epicatequina. Além disso, tem sido reportada uma elevada concentração de proantocianidinas nas cascas do bagaço da cultivar Alicante Bouschet (Ky *et al.*, 2014).

É conhecido que durante a estocagem do vinho podem ocorrer reações de condensação direta entre as antocianinas e as proantocianidinas que levam à formação de diferentes compostos com características que dependem do tipo de ligação. Os novos compostos contribuem para a cor vermelha e permitem que se mantenha estável, podendo se intensificar mesmo com a desapareição das antocianinas (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). A presença desses pigmentos complexos poderia estar relacionada à diminuição da concentração das antocianinas monoméricas no extrato e também podem contribuir para manter a cor vermelha escura durante a estocagem.

Blanco-Vega *et al.* (2011), ao estudarem a degradação de antocianinas numa solução modelo de vinho elaborada com extrato de uva Syrah, observaram que a diminuição da concentração das antocianinas foi devida à formação de pigmentos poliméricos após a condensação de antocianinas, principalmente, com flavanóis. Os autores detectaram por CLAE-DAD e CLAE-EM um pico correspondente à formação de um aduto, resultado da reação de condensação direta entre a malvidina-3-*O*-glicosídeo e a (+)-catequina com a consequente formação de um precipitado insolúvel de cor vermelha ao final do estudo de estocagem. Este pigmento derivado de antocianinas é um composto bem conhecido na composição dos vinhos durante a estocagem e foi identificado anteriormente por Castillo-Muñoz *et al.* (2009) em vinhos da variedade Garnacha Tintoreira.

No presente estudo também foi observada a formação do precipitado de cor vermelha intensa ao longo do tempo da estocagem, principalmente na temperatura de refrigeração. É conhecido que o perfil de compostos fenólicos encontrado nos vinhos é semelhante ao das uvas que lhe dão origem (Castillo-Muñoz *et al.*, 2009). Levando em consideração que tem sido demonstrado que os subprodutos da vinificação ainda contêm muitos dos compostos fenólicos presentes na composição das uvas e vinhos, é possível que novos pigmentos também possam se formar durante a estocagem do extrato de casca de uva, como acontece no vinho, pela semelhança na composição. Além disso, foi reportado recentemente por Zhang *et al.* (2018) que os ácidos fenólicos (gálico e elágico) presentes na composição do extrato em estudo atuam como copigmentos e também afetaram a expressão da cor vermelha em vinhos devido a reações de copigmentação com as antocianinas, dando lugar a outros pigmentos derivados os quais exibiram melhores propriedades cromáticas.

Gauche *et al.* (2010) afirmaram que os ácidos fenólicos como o ácido tânico e o ácido gálico atuam como co-pigmentos que, combinados com as antocianinas, permitem melhorar a

sua estabilidade e manter a cor vermelha do extrato de casca de uva cv. Cabernet Sauvignon. Os autores observaram desvios hipercrômicos e batocrômicos no comprimento de onda de absorvância máxima (520 nm), típicos de reações de copigmentação, principalmente em valores de pH menores do que 3, condição onde existe uma elevada concentração de antocianinas na forma colorida (cátion *flavilium*), porém o máximo efeito da copigmentação foi reportado a pH= 3,3. Em pH=3 foi observada uma perda da cor das antocianinas no extrato controle, porém uma maior retenção da cor pela presença dos copigmentos, o que indica que esses compostos inibem a formação da pseudobase (incolor) do cátion *flavilium*. Devido ao fato desses valores de pH serem muito próximos ao pH do extrato concentrado avaliado neste estudo (2,91), provavelmente as reações de copigmentação tenham uma marcada influência na estabilidade das antocianinas e da cor deste extrato durante a estocagem.

3.7 Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de casca de uva

Foi estudada a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato concentrado e diluído (5, 10, 25 e 50% (v/v) de casca de uva da cultivar Alicante Bouschet usando a técnica de difusão em poços. A Tabela 5 lista os halos de inibição formados pelos diferentes microrganismos e foi observado que o diâmetro de todos os halos foi maior de 9 mm, o que significa que tanto o extrato de casca de uva concentrado como as diferentes diluições testadas apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos avaliados.

Tabela 5 Halos de inibição (diâmetro em mm) do crescimento bacteriano a diferentes concentrações (%) do extrato líquido concentrado de casca de uva

Extrato de casca de uva (%)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Salmonella Enteritidis</i>
5	A 19,00 ± 0,71 a	C 11,50 ± 0,71 b	C 9,50 ± 0,71 b
10	B 12,00 ± 2,83 a	C 10,50 ± 0,71 a	C 10,50 ± 0,71 a
25	AB 16,50 ± 0,71 a	BC 15,00 ± 1,41 a	B 16,50 ± 0,71 a
50	A 19,00 ± 1,41 a	AB 19,00 ± 1,41 a	A 21,50 ± 0,71 a
100	A 19,00 ± 1,41 a	A 23,00 ± 1,41 a	AB 19,00 ± 1,41 a

Valores expressos como média ± desvio padrão ($n = 2$). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os halos formados pelo mesmo microrganismo usando diferentes concentrações de extrato líquido concentrado de casca de uva de acordo com o teste Tukey ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os halos formados por microrganismos diferentes usando a mesma concentração de extrato líquido concentrado de casca de uva de acordo com o teste Tukey ($p < 0,05$).

Como esperado, o tamanho do halo aumentou com o aumento da concentração do extrato, com exceção dos halos formados pela bactéria *Staphylococcus aureus*. O tamanho do halo formado por esta bactéria foi o maior para concentrações do extrato de 5–10%, sendo a mais sensível e indicando que o extrato é efetivo contra essa bactéria a baixas concentrações. Porém, o tamanho do halo formado pela bactéria *Staphylococcus aureus* foi similar usando tanto 5% do extrato quanto o extrato concentrado (19 mm), pois não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os halos formados usando as diluições 5, 25, 50% e o extrato de casca de uva concentrado. Também não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os halos formados pelas diferentes bactérias quando foi usada a mesma concentração de extrato (10, 25, 50%) e o extrato concentrado. Porém, quando foi testada a

diluição de 5% de extrato, o halo formado pela bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus* foi muito maior e diferente significativamente ($p < 0,05$) dos halos formados pelas bactérias Gram negativas *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis. A maior resistência mostrada pelas bactérias Gram negativas está relacionada ao fato de que a membrana celular possui uma dupla camada, pois além da camada de peptidoglicano (também presente nas bactérias Gram positivas), as bactérias Gram negativas possuem uma membrana externa que atua como uma forte barreira seletiva controlando a passagem de substâncias para dentro e para fora da célula.

Um estudo desenvolvido por Sagdic *et al.* (2012), similar ao realizado no presente trabalho, testou a atividade antimicrobiana de extrato de bagaço de uva cv. Emir e Kalecik karasi contra várias bactérias, dentre elas: *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus*. Os autores usaram também diferentes concentrações e observaram que o aumento dos halos foi dependente da concentração. Os halos formados pelas bactérias *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis foram maiores que os observados no presente estudo usando as concentrações de 5 e 10% de extrato. Porém os halos formados pelo *Staphylococcus aureus* foram muito menores. As diferenças entre ambos estudos estão relacionadas com as diferentes cultivares de uvas, formas de obtenção e, conseqüentemente, a diferente composição dos extratos avaliados; além das diferenças quanto às espécies de bactérias testadas e a execução do teste antimicrobiano.

Outro estudo, desenvolvido por Papadopoulou *et al.* (2005), avaliou a atividade antimicrobiana de diferentes extratos de vinhos tintos contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. Os autores observaram que os halos de inibição aumentaram na medida que aumentava a concentração do extrato, de forma similar ao resultado obtido no presente estudo. Na maioria dos extratos testados, os maiores halos foram formados pela bactéria *Staphylococcus aureus*, sendo esta a mais sensível. O efeito inibitório contra os patógenos testados foi relacionado com a composição dos extratos (ricos em antocianinas, flavonóis e ácidos fenólicos), sendo atribuído principalmente aos ácidos fenólicos. De acordo com a literatura, vários ácidos fenólicos como os ácidos vanílico, protocatecuico e siríngico isolados de fontes naturais inibiram o crescimento tanto de bactérias Gram positivas quanto de bactérias Gram negativas (Aziz *et al.*, 1998).

Nohynek *et al.* (2006) constataram que extratos fenólicos obtidos a partir de frutas vermelhas desintegraram a membrana externa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium e o ácido gálico foi capaz de permeabilizar a membrana. Por outro lado, Quave *et al.* (2012) observaram que o ácido elágico e seus derivados presentes na composição da raiz de *Rubus ulmifolius* Schott. (Rosaceae) poderia limitar a formação de biofilme em diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*.

Dentre os ácidos fenólicos, o ácido gálico, presente na composição do extrato de semente de uva, tem sido identificado como responsável pela atividade antibacteriana do extrato. Ensaios de correlação entre estrutura e atividade revelaram que os três grupos hidroxila presentes neste composto apresentaram atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis e também que todos os substituintes do anel benzênico foram efetivos contra *Staphylococcus aureus* (Tesaki *et al.*, 1999).

Os resultados deste estudo sugerem que o extrato concentrado de casca de uva poderia representar uma alternativa de baixo custo como agente antimicrobiano de origem natural efetivo contra *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis ATCC 13076 e *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

CAPÍTULO III

DIGESTÃO *IN VITRO* DE UM EXTRATO LÍQUIDO CONCENTRADO DE CASCA DE UVA CV. ALICANTE BOUSCHET (*VITIS VINIFERA* L.): BIOACESSIBILIDADE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E EFEITO NA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA

RESUMO

A uva Alicante Bouschet (*Vitis vinifera* L.) é uma cultivar que têm sido utilizada para a produção de vinhos na região do semiárido do Brasil. Essa atividade gera muitos resíduos, ainda ricos em compostos fenólicos. Neste trabalho, foi determinada a bioacessibilidade dos compostos fenólicos de um extrato líquido concentrado obtido a partir da casca da uva cv. Alicante Bouschet. A influência sobre a atividade metabólica dos microrganismos da microbiota intestinal foi avaliada usando um modelo estático de digestão *in vitro*. Os compostos fenólicos foram analisados por Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) no extrato bruto e após a digestão oral, gástrica, intestinal e fermentação colônica. Os efeitos do extrato sobre os principais microrganismos representativos da microbiota (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp. e coliformes totais) foram monitorados após 24 horas de fermentação *in vitro* usando a técnica de contagem de colônias em placas. A atividade fermentativa foi avaliada de acordo com a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGVCC) por Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-FID) e a atividade proteolítica pela produção do íon amônio. Os resultados mostraram uma baixa bioacessibilidade de antocianinas monoméricas e flavanóis (23% e 25%, respectivamente), após a digestão *in vitro*; e uma elevada bioacessibilidade dos ácidos fenólicos (> 100%) após a digestão intestinal e a fermentação colônica *in vitro*. Apesar de que 24 horas de fermentação colônica *in vitro* não foram suficientes para estimular a multiplicação dos microrganismos, os ácidos: acético (16,72 mmol.L⁻¹), propiônico (0,87 mmol.L⁻¹) e butírico (traços) foram detectados no extrato fermentado. Os ácidos butírico e propiônico somente foram detectados após a fermentação do extrato. A produção de amônio foi baixa (10,05 mg NH₄⁺. L⁻¹) após 24 h e não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação com o tempo inicial (12,60 mg NH₄⁺. L⁻¹). Isto sugere que o extrato de casca de uva favoreceu a atividade metabólica da microbiota intestinal e dessa forma, poderia ter um efeito prebiótico potencial para a modulação da microbiota em longo prazo.

Palavras-chave: extrato de bagaço de uva, Alicante Bouschet, digestão *in vitro*, bioacessibilidade, compostos fenólicos, atividade metabólica, microbiota

ABSTRACT

The Alicante Bouschet (*Vitis vinifera* L.) is a grape cultivar that has been used for the production of wines in the Brazilian semi-arid region. This activity generates many residues, still rich in phenolic compounds. In this work, a concentrated liquid extract was obtained from Alicante Bouschet grape pomace and the phenolic compounds bioaccessibility was determined. An *in vitro* static model was used to evaluate the influence of the extract on the metabolic activity of the intestinal microbiota. Phenolic compounds were analyzed by high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) in the crude extract and after oral, gastric and intestinal digestion and colonic fermentation. Effects of the extract upon major microorganisms of the human microbiota (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp. and total coliforms) were monitored over 24 h using plate count techniques. The fermentative activity was evaluated by short chain fatty acids (SCFAs) production using gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID), and by proteolytic activity according to ammonium ion production. The results showed a low bioaccessibility of anthocyanins and flavanols (23% and 25%, respectively), after *in vitro* digestion; and high bioaccessibility of phenolic acids (> 100%) after *in vitro* intestinal digestion and colonic fermentation. Although 24 h of *in vitro* colonic fermentation were not enough to stimulate the microbiota growth, acetic acid (16.72 mmol.L⁻¹), propionic (0.87 mmol.L⁻¹) and butyric (traces) acids were detected in the fermented extract. Propionic and butyric acids were only detected after the extract fermentation. Ammonium production was low (10.05 mg NH₄⁺. L⁻¹) after 24 h and there were no significant difference ($p > 0.05$) in relation to the initial time (12.60mg NH₄⁺. L⁻¹). This suggests that the grape pomace extract favored the metabolic activity of the intestinal microorganisms and therefore, could have a potential prebiotic effect for the long-term modulation of the microbiota.

Keywords: grape pomace extract, Alicante Bouschet, *in vitro* digestion, bioaccessibility, phenolic compounds, metabolic activity, microbiota

1 INTRODUÇÃO

Atualmente existe um interesse cada vez mais crescente em elucidar o metabolismo dos compostos fenólicos motivo pelo qual, além de conhecer a composição química da matriz original e a sua estabilidade durante o processamento e estocagem, resulta de grande importância estudar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos presentes. Estudos têm demonstrado que a atividade biológica atribuída aos compostos fenólicos é devida principalmente aos metabólitos formados durante a passagem pelo trato gastrointestinal e também pela ação da microbiota intestinal, e não aos compostos fenólicos originários da matriz (Piwowarski *et al.*, 2014; Ozdal *et al.*, 2016; Gil-Sánchez *et al.*, 2017).

Tem sido reportado que a estabilidade dos compostos fenólicos, depende das propriedades físico-químicas e estrutura de cada composto e da interação com os constituintes do meio gástrico e com outros componentes da própria matriz (Podsędek *et al.*, 2014; Lingua *et al.*, 2018). Desse modo, tem sido observada uma redução no teor de antocianinas monoméricas após a digestão intestinal, provavelmente devido ao pH elevado que provoca a transformação do cátion *flavilium* (vermelho) em base chalcona (incolor) (Pérez-Vicente *et al.*, 2002; McDougall *et al.*, 2005; Kuck *et al.*, 2017). Além disso, a microbiota intestinal biotransforma os compostos fenólicos (antocianinas e flavonóis) em metabólitos de menor peso molecular, porém de maior importância biológica que os seus precursores (Piwowarski *et al.*, 2014; Ozdal *et al.*, 2016).

Segundo Lila *et al.* (2011) e Alminger *et al.* (2014), a bioacessibilidade pode ser definida como a fração de um composto que é digerida e liberada de sua matriz no trato gastrointestinal e que, portanto, torna-se potencialmente disponível para absorção intestinal. As metodologias utilizadas para avaliar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos são baseadas na fisiologia do trato gastrointestinal do corpo humano. As diferentes fases da digestão são simuladas submetendo-se os alimentos a soluções de enzimas e sais em temperaturas, tempos e pHs característicos de cada fase (oral, gástrica, intestinal) e mantidas sob agitação constante para simular o peristaltismo. Os métodos mais usados consistem em modelos de digestão *in vitro*, que são menos onerosos e mais rápidos quando comparados aos modelos *in vivo* e não possuem restrições éticas (Alminger *et al.*, 2014; Dueñas *et al.*, 2015).

A maioria dos modelos *in vitro* utilizados são estáticos e trabalham com condições pré-fixadas quanto às concentrações e volumes do material que será digerido, das enzimas digestivas e sais, simulando as condições do sistema gastrointestinal e também permitem avaliar a influência que exercem alguns compostos (fenólicos, prebióticos) na modulação da microbiota intestinal (Dueñas *et al.*, 2015).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos para avaliar as transformações dos compostos fenólicos após a digestão *in vitro* em diferentes matrizes como uvas frescas (Tagliazucchi *et al.*, 2010), amoras (Liang *et al.*, 2012), mirtilos (Correa-Betanzo *et al.*, 2014), vinhos de mirtilo, amora preta e cereja (Celep *et al.*, 2015), pós de cascas de jambo, jabuticaba e jamelão (Peixoto *et al.*, 2016) e bagaço de uva cv. Merlot (*Vitis vinifera* L.) (Corrêa *et al.*, 2017). Os resultados indicaram que após o processo de digestão *in vitro* houve mudanças no perfil (qualitativo e quantitativo) de compostos fenólicos dos extratos brutos o que influenciou diretamente nas atividades biológicas dos extratos. Após a digestão intestinal, todos os autores reportaram que os teores de antocianinas diminuíram e a bioacessibilidade destes compostos foi baixa, porém a atividade antioxidante dos extratos digeridos aumentou devido à presença dos produtos de degradação das antocianinas.

Na maioria dos trabalhos sobre digestão gastrointestinal e fermentação colônica *in vitro* desenvolvidos com subprodutos de uva, têm sido utilizados extratos concentrados sólidos obtidos por liofilização (Corrêa *et al.*, 2017) ou por *spray drying* (Gil-Sánchez *et al.*, 2017). Contudo, estudos com extratos na forma líquida não tem sido descritos na literatura. Diante disso, os objetivos do presente estudo foram estudar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos de um extrato líquido concentrado obtido a partir da casca da uva cv. Alicante Bouschet usando um modelo estático de digestão e fermentação colônica *in vitro* e também, avaliar a sua influência sobre a atividade metabólica e a modulação dos microrganismos da microbiota intestinal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostra e reagentes

O bagaço fresco (cascas, polpa residual e sementes) de uva da variedade Alicante Bouschet, foi obtido da produção de vinho tinto da vinícola Rio Sol, do grupo ViniBrasil (Lagoa Grande, PE, Brasil). O bagaço foi seco em secador convectivo de bandejas, a 60 °C por 24 horas e processado em despolpadeira Bonina 0.25 df (Itametal, Itabuna, Brasil) para separar as cascas das sementes. A casca foi moída em moinho de discos (Perten Instruments AB, Huddinge, Suécia), obtendo-se a farinha da casca de uva com (D₅₀) de 521 ± 78,9 µm determinado em um analisador de tamanho de partícula por difração a laser (Microtrac, modelo S3500, Nova Iorque, E.U.A.).

Para a obtenção do extrato de casca de uva foram usados etanol absoluto P.A. (Emplura[®], Merck, Alemanha) e água destilada. Os sais, as enzimas utilizadas nos experimentos de digestão *in vitro* e os componentes do meio alimentar basal foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®]. Utilizou-se também, HCl P.A. (Emplura[®], Merck, Alemanha) e água Milli-Q para o preparo das soluções.

2.2 Preparação do extrato líquido concentrado de casca de uva

A farinha da casca de uva foi submetida ao processo de extração sólido-líquido em banho termostático (Marconi - MA 093, São Paulo, Brasil) a 40 °C, utilizando solução hidroetanólica 50% (v/v) acidificada com 2% (m/v) de ácido cítrico, razão sólido:líquido de 1:10, sob agitação mecânica (200 rpm) durante uma hora (Ruíz-García *et al.*, 2019). Após a extração, os sólidos suspensos foram removidos por filtração a vácuo. O extrato líquido foi concentrado por rotaevaporação a vácuo (Büchi, Flawil, Suíça) a 50 °C e agitação de 40 rpm, até a metade do volume inicial, para evaporação do etanol. O extrato líquido concentrado foi armazenado a -20 °C em recipientes de cor âmbar para posteriores análises.

2.3 Digestão *in vitro*

A digestão *in vitro* foi simulada de acordo com a metodologia descrita por Oomen *et al.* (2003), Failla e Chitchumronchokchai (2005) e Gião *et al.* (2012). Para a simulação da fase oral, 7 g do extrato foram misturados com 7 mL da solução saliva contendo α-amilase (0,29 mg.mL⁻¹), mucina (0,1 mg.mL⁻¹) e solução de sais (KCl 89,6 g.L⁻¹; KSCN 20 g.L⁻¹; NaH₂PO₄ 88,8 g.L⁻¹; Na₃PO₄ 57 g.L⁻¹, NaCl 175,3 g.L⁻¹; NaOH 1M e ureia 25 g.L⁻¹) em tubos de centrífuga de 50 mL, que foram incubados a 37 °C em banho termostático com agitação de 60

rpm durante 10 minutos. Decorrido esse tempo, os tubos foram imersos imediatamente em banho de gelo para cessar a atividade enzimática.

Para a simulação da fase gástrica, o pH foi reduzido para $2,5 \pm 0,1$ com HCl 1 M e 2 mL da solução de pepsina (40 mg.mL^{-1} em HCl 0,1 M) foram adicionados aos tubos e submetidos à incubação a 37°C em banho termostático com agitação de 60 rpm por 1 hora. Após a digestão gástrica, os tubos foram colocados em banho de gelo. Na fase intestinal, 3 mL da solução de bile (40 mg.mL^{-1} em NaHCO_3 0,1 M) e 2 mL da solução pancreatina-lipase (10 mg.mL^{-1} de pancreatina e 5 mg.mL^{-1} de lipase em NaHCO_3 0,1 M) foram adicionados aos tubos. O pH da mistura foi corrigido para $6,5 \pm 0,1$ utilizando NaOH 1M. O volume dos tubos foi completado até os 50 mL com solução de sais contendo $0,69 \text{ mg.mL}^{-1}$ de CaCl_2 , 7 mg.mL^{-1} de NaCl e $0,38 \text{ mg.mL}^{-1}$ de KCl e foram incubados em banho termostático a 37°C com agitação de 60 rpm por 2 horas. Finalizada a fase intestinal da digestão, os tubos foram colocados em banho de gelo para cessar a atividade das enzimas. Após cada fase da digestão, foram coletados 5 mL das amostras digeridas (previamente centrifugadas a 5000 G por 15 minutos), filtradas em membrana de $0,22 \mu\text{m}$ (TPP, Trasadingen, Switzerland) e armazenadas a -20°C para posteriores análises.

A bioacessibilidade *in vitro* dos compostos fenólicos foi calculada a partir da comparação entre os teores de cada composto antes (no extrato bruto) e após cada fase da digestão segundo a equação

$$\% \text{ Bioacessibilidade} = \frac{\text{teor (composto) final}}{\text{teor (composto) inicial}} \times 100.$$

2.4 Simulação da fermentação colônica *in vitro*

2.4.1 Preparação da suspensão de fezes

As amostras de fezes foram provenientes de um único doador, sadio e que não fez uso de antibióticos por pelo menos 6 meses antes do estudo. A amostra foi coletada no mesmo lugar e dia da realização do experimento e armazenada em jarra (Anaerobar 2,5 L, Oxoid Ltd) com kit gerador de anaerobiose (AnaeroGen, Oxoid). Posteriormente, a amostra foi pesada (20 g) e diluída, 1:10 (m/v), com solução salina de tampão fosfato estéril (0,1 M; pH 7,4) e homogeneizada. A suspensão fecal resultante foi inoculada em frascos simulando a fase de fermentação colônica.

2.4.2 Fermentação colônica *in vitro*

A simulação da fase de fermentação colônica *in vitro* foi realizada como descrito por Guergoletto *et al.* (2016). Foi utilizado o meio alimentar basal contendo amido de batata (3 g.L^{-1}), pectina (2 g.L^{-1}), arabinogalactana (1 g.L^{-1}), mucina suína gástrica tipo III (4 g.L^{-1}), peptona (1 g.L^{-1}), triptona (1 g.L^{-1}), glicose ($0,4 \text{ g.L}^{-1}$), extrato de levedura (3 g.L^{-1}), L-cisteína ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$), xilana extraída do bagaço de cana (1 g.L^{-1}) e água destilada. O pH do meio basal foi ajustado a 7,0 e autoclavado para esterilização. Para promover as condições anaeróbias, o meio foi submetido a atmosfera de N_2 livre de O_2 (15 mL.min^{-1}) por 12 horas. Para o processo de simulação da fermentação colônica, os frascos digestores de 100 mL, previamente esterilizados (triplicata), contendo 45 mL do meio alimentar basal foram inoculados com 5 mL de suspensão fecal (1:10 m/v) e 5 mL de extrato digerido (não centrifugado). Os frascos digestores foram incubados em banho termostático a 37°C e o pH foi mantido em 6,8 usando um controlador de pH (BEL Engineering®, Milano, Itália). Os frascos digestores foram colocados em jarras de anaerobiose (Anaerobar 2,5 L, Oxoid Ltd) com kit gerador de anaerobiose (AnaeroGen, Oxoid)

e indicador de anaerobiose (AnaeroGen, Oxoid) durante as 24 horas de duração do experimento para mimetizar as condições anaeróbicas do intestino grosso. No tempo inicial (0 h) e ao final do experimento (24 h) foram coletadas 5 mL de amostra para análise de ácidos graxos voláteis de cadeia curta e de íons amônio. Foi coletado 1 mL de amostra para a cultura em placas de microrganismos típicos da microbiota intestinal.

2.5 Métodos analíticos

2.5.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais no extrato bruto e nos extratos digeridos foi determinado com o reagente Folin-Ciocalteu de acordo com o método descrito por Singleton e Rossi (1965) e modificado por Georgé *et al.* (2005). Primeiramente, foram pipetados 500 µL do extrato ao qual adicionou-se 2,5 mL de solução de Folin-Ciocalteu 10% (v/v). A amostra ficou em repouso em temperatura ambiente por 2 minutos. Foram adicionados 2,0 mL de solução de carbonato de sódio 7,5% e após homogeneização em vórtex, as amostras foram incubadas em banho termostático a 50 °C durante 15 minutos. Ao fim da reação, os tubos foram retirados e colocados em banho de gelo por 30 segundos. A leitura da absorbância foi realizada a 760 nm em espectrofotômetro (Shimadzu® UV-1800, Kyoto, Japão). O teor de compostos fenólicos totais foi determinado usando uma curva padrão de ácido gálico com concentrações de 5 a 100 mg/L ($y = 0,0105x + 0,0047$; $R^2=0,9998$). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente (AGE) por L de extrato de uva.

2.5.2 Determinação do teor de antocianinas monoméricas por pH diferencial

A determinação do teor de antocianinas monoméricas no extrato bruto e nos extratos digeridos foi realizada pela metodologia de pH diferencial conforme descrito por Giusti e Wrolstad (2001). Os extratos foram diluídos em soluções tampões pH 1,0 (solução de cloreto de potássio 0,025 M acidificada com HCl concentrado) e pH 4,5 (solução de acetato de sódio 0,4 M acidificada com HCl concentrado). Após filtração, a absorbância foi medida a 520 e 700 nm em espectrofotômetro (SPECORD 205, Analytik Jena AG, Alemanha). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em mg de pigmentos monoméricos equivalentes a malvidina-3-*O*-glicosídeo (coeficiente de extinção molar de 29500 L.cm⁻¹.mol⁻¹ e peso molecular de 562,5 g.mol⁻¹) por L de extrato de uva.

2.5.3 Capacidade antioxidante pelo método ORAC

A determinação da atividade antioxidante total pelo método do *Oxygen Radical Antioxidant Capacity* (ORAC) foi conduzida baseada no método descrito por Zulueta *et al.* (2009) em leitor de fluorescência com microplaca preta de 96 poços TECAN Infinite® 200 Series (Tecan, Männedorf, Suíça). O método ORAC se fundamenta na capacidade dos compostos antioxidantes de uma amostra de sequestrar os radicais peróxido gerados pelo dicloridrato de 2,2-Azobis(2-metilpropionamida) (AAPH), evitando a degradação da fluoresceína (probe molecular) e conseqüentemente o decaimento da intensidade da emissão da fluorescência. A atividade antioxidante do extrato líquido concentrado comparou-se ao ácido 6-hidroxi-2-5-7-8-tetrametilcromo 2-carboxílico (Trolox), antioxidante sintético hidrossolúvel utilizado como padrão na análise.

Para a análise dos compostos antioxidantes hidrofílicos, todas as soluções foram preparadas em tampão fosfato 75 mmol pH 7,4. Primeiramente, 80 µL dos extratos previamente diluídos ou das soluções padrão de Trolox foram misturados com 80 µL de fluoresceína (78 nmol) e colocados em cada poço. A microplaca foi inserida no fluorímetro a 37 °C sob agitação durante 10 minutos para a leitura da fluorescência. Após a pre-incubação, foram adicionados 40 µL solução de AAPH (221 mmol) em todos os poços excluindo os de referência (200 µL de fluoresceína pura). A intensidade da fluorescência ($\lambda_{exc}= 485\text{nm}$, $\lambda_{em}= 535 \text{ nm}$) foi monitorada cada minuto, em modo cinético, até obter um valor de fluorescência 5% inferior à leitura inicial. Para calcular a área abaixo da curva foram plotados os dados de fluorescência em relação ao tempo para todas as amostras, as soluções padrão de Trolox e o branco, usando o programa GraphPad Prisma versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, E.U.A). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram calculados por interpolação na curva de calibração de Trolox com concentrações de 10 a 120 µmol ($y = 528347x + 7 \times 10^6$; $R^2=0,9877$) e expressos em µmol de ET (equivalente ao Trolox) por L de extrato de uva.

2.5.4 Capacidade antioxidante pelo método ABTS^{•+}

A capacidade antioxidante do extrato bruto e dos extratos digeridos foi determinada pelo método descrito por Re *et al.* (1999). Para o preparo do radical ABTS^{•+}, 5 mL da solução aquosa de ABTS (2,2' azino-bis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico) (7 mmol) foram misturados com 88 µL de persulfato de potássio (140 mmol). A solução foi armazenada no escuro, à temperatura ambiente, durante 16 horas antes do uso. O radical ABTS^{•+} foi diluído em etanol 95% v/v e mantido em agitação constante até obter-se uma medida de absorvância de $0,700 \pm 0,020$ em 734 nm. Para análise, 30 µL do extrato foram misturados com 3 mL da solução etanólica de ABTS^{•+} e homogeneizados em vórtex. A absorvância foi medida a 734 nm em espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu, Corporation, Kyoto, Japão) após 6 minutos da adição do radical e o etanol 95% v/v foi usado como branco da análise. A capacidade antioxidante do extrato foi calculada por equivalência ao Trolox, usado como padrão na curva de calibração com concentrações de 100 a 2000 µmol ($y = 0,0003x - 0,0008$; $R^2=0,9938$). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em µmol de ET (equivalente ao Trolox) por L de extrato de uva.

2.5.5 Análise de antocianinas monoméricas por CLAE-DAD

A preparação das amostras digeridas consistiu em pipetar 2 mL do sobrenadante das amostras centrifugadas, aos quais foram adicionados 100 µL de ácido fórmico e 2 mL de solução de injeção contendo ácido fórmico 5% em água:metanol 90:10 (v/v). Os tubos foram colocados no ultrassom por 10 minutos. Posteriormente as soluções foram filtradas com membrana de 0,22 µm (TPP, Trasadingen, Switzerland) e transferidas para balões volumétricos de 5 mL cujo volume foi completado com solução de injeção. O extrato bruto (1 mL) foi misturado com a solução de injeção (1 mL). Após a diluição, 1 mL foi pipetado em vials para a análise cromatográfica.

A análise cromatográfica das antocianinas presentes no extrato bruto e os extratos digeridos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Santiago *et al.* (2010) em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Waters[®] Alliance modelo 2690/5, equipado com detector de arranjo de fotodiodos Waters[®] modelo 2996 (Waters, Milford, MA, USA), com varredura do espectro UV-Vis na faixa de 210 a 600 nm e quantificação em 520 nm. Uma coluna de fase reversa Thermo BDS Hypersil C₁₈ (100 × 4,6 mm; 2,4 µm) foi usada para a separação das antocianinas. As antocianinas foram eluídas em gradiente de ácido fórmico 5%

em metanol e acetonitrila, com fluxo de 1,0 mL/min e o tempo de corrida foi de 35 minutos. A fase A utilizada consistia em ácido fórmico (5%) e metanol (95%), e a fase B apenas acetonitrila (100%). O gradiente utilizado de fase A foi 0 min (95%), 2 min (93%), 10 min (90%), 15 min (87%), 16 min (85%), 20 min (83%), 30 min (80%), 33 min (95%), 35 min (95%). A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C e o volume de injeção foi 20 µL. As antocianinas foram identificadas por comparação dos tempos de retenção e os espectros UV/Vis com os de amostras e padrões puros. A quantificação das antocianinas foi realizada utilizando a curva analítica da malvidina-3-*O*-glicosídeo, antocianina majoritária na amostra. Os resultados foram expressos em mg de malvidina-3-*O*-glicosídeo equivalentes por L de extrato de casca de uva.

2.5.6 Identificação e quantificação de ácidos fenólicos e flavanóis CLAE-DAD

A análise de ácidos fenólicos e flavanóis foi realizada no extrato bruto e nos extratos digeridos. Por se tratar de extratos livres de sólidos, não foi realizada a etapa de hidrólise. O extrato bruto (1 mL) foi misturado com a solução de injeção (1 mL). Os extratos digeridos, previamente centrifugados, foram filtrados com membrana de 0,22 µm (TPP, Trasadingen, Switzerland) e colocados em vials para a análise cromatográfica.

A análise cromatográfica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Nascimento *et al.* (2017), 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 Thermo BDS Hypersil C₁₈ (100 mm × 4,6 mm; 2,4 µm) a 40 °C, em modo de eluição por gradiente usando uma solução aquosa de ácido fosfórico (95%) e acetonitrila (5%), com fluxo de 1 mL.min⁻¹, volume de injeção de 10 µL e tempo de corrida de 30 minutos. Aos 12 minutos da corrida cromatográfica a concentração de acetonitrila foi incrementada para 12%, aos 18 minutos para 20% e aos 20 minutos para 50% de acetonitrila. A concentração de acetonitrila foi mantida em 50% até os 25 minutos e nos minutos finais retornou à condição inicial (5%). A quantificação foi realizada por padronização externa através da construção de curvas analíticas a partir de padrões analíticos comerciais. Os resultados foram expressos em mg de composto por L de extrato de casca de uva.

2.5.7 Contagem de colônias em placas

Uma alíquota (1 mL) dos reatores após a simulação da fermentação colônica *in vitro* e do reator controle (amostra sem o extrato de casca de uva digerido), foi submetida a diluições decimais seriadas em água peptonada (0,1%) estéril. Usando a técnica de semeadura em profundidade (Pour Plate), 1 mL de cada diluição foi inoculado em placas de Petri estéreis (duplicata para cada diluição). Posteriormente, foram adicionados os diferentes tipos de meios de cultura seletivos para cada microrganismo: ágar De Man Rogosa e Sharpe (MRS) acidificado com ácido acético glacial (pH = 5,4) para *Lactobacillus* spp. e *Reinforced Clostridial Agar* (RCA) para *Clostridium* spp. Também foi usado o meio específico para *Bifidobacterium* spp. que consiste em RCA adicionado de *Bifidobacterium iodoacetate medium 25* (BIM-25) que contém vários antibióticos como ácido nalidíxico (0,02 g.L⁻¹), sulfato de kanamicina (0,05 g.L⁻¹), sulfato de polimixina B (0,0085 g.L⁻¹), outros ingredientes como ácido iodoacético (0,025 g.L⁻¹) e cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (0,025 g.L⁻¹). Para avaliar a multiplicação dos Coliformes totais, as amostras foram inoculadas utilizando Petrifilms®. O plaqueamento foi realizado no tempo inicial (tempo 0) e após 24 horas de fermentação colônica *in vitro*. As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose (Anaerojar 2,5 L, Oxoid Ltd) com kit gerador de anaerobiose (AnaeroGen, Oxoid) e indicador de anaerobiose (AnaeroGen, Oxoid), a 37 °C

durante 5 dias para todos os meios de cultura com exceção dos Coliformes totais que foram incubados por 48 horas em estufa a 35 °C. A contagem das placas foi realizada para determinação do log de unidades formadoras de colônias (UFC). O resultado foi expresso em UFC. mL⁻¹.

2.5.8 Análise de ácidos graxos voláteis (AGV)

A extração dos AGV foi realizada no extrato bruto não filtrado proveniente da fermentação colônica. Alíquotas de 1 mL de extrato foram transferidas para tubos tipo Falcon de 15 mL. Adicionou-se 200 µL de solução de ácido sulfúrico 2 M e 100 µL de solução de ácido crotônico como padrão interno (9 a 10 mg/mL em éter etílico). A extração foi realizada em três etapas sucessivas, com 2, 2 e 1 mL de éter etílico. Em cada etapa, após a adição do solvente, realizou-se a agitação em vortex durante 30 segundos e foi separado o sobrenadante. O sobrenadante foi transferido para tubos de 7 a 10 mL e aguardou-se a evaporação do solvente em capela até volume final de 2 mL.

A análise foi realizada por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução de acordo com o método descrito por Adorno *et al.* (2014) com modificações, em cromatógrafo (Agilent Technologies 7890A) com detector de ionização de chama. A separação cromatográfica foi realizada em coluna capilar de sílica fundida de FFAP (*Free Fatty Acids Phase*) (25 m × 0,2 mm × 0,30 µm). A programação da temperatura do forno foi: temperatura inicial de 40 °C por 1 minuto, de 40 a 110 °C com rampa de aquecimento de 20 °C.min⁻¹; de 110 a 180 °C com rampa de 10 °C.min⁻¹; de 180 a 230 °C com rampa de 20 °C.min⁻¹ e 5 minutos na temperatura final de 230 °C. As temperaturas do injetor e detector foram de 250 e 280 °C, respectivamente. O injetor foi operado no modo de divisão de fluxo na razão de 1:50 e o volume de injeção foi de 1 µL. O hidrogênio foi usado como gás de arraste com pressão de 10,9 psi e a uma velocidade de fluxo de 1 mL.min⁻¹. A identificação foi realizada por comparação dos tempos de retenção das amostras com padrões puros dos ácidos graxos injetados nas mesmas condições. A quantificação foi realizada pelo método de adição de padrão interno (ácido crotônico). Primeiramente, foram preparadas curvas de calibração a partir das soluções de estoque dos padrões analíticos de cada ácido graxo (ácido acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico, hexanóico, heptanóico e octanóico) as quais adicionou-se o padrão interno e foram injetadas nas mesmas condições que as amostras. Posteriormente, foi calculada a relação entre as áreas dos picos de cada ácido graxo e a área do padrão interno nos cromatogramas das soluções padrão e das amostras. Também foi calculada a relação de concentração entre as soluções padrão e o ácido crotônico para obter as equações e calcular a concentração de cada ácido graxo nas amostras. As análises foram realizadas em duplicata (n = 2) e os resultados expressos em mmol de ácido graxo por L de amostra digerida.

2.5.9 Determinação do íon amônio

Para quantificar o íon amônio (NH₄⁺) nas amostras no início (t = 0 horas) e após 24 horas da fermentação colônica foi usado o kit composto por um colorímetro analisador de amônio Hanna Checker Faixa alta HI733, Hanna Instruments e os reagentes de acordo com as normas técnicas do equipamento. O método foi adaptado do ASTM Manual of Water and Environmental Technology, D1426-93, Método de Nessler. O princípio do método fundamenta-se na reação da amônia livre presente nas amostras com solução alcalina de tetraiodomercurato (II) de potássio (conhecida como reagente de Nessler) para formar um complexo de cor amarela. A concentração de amônio é então medida colorimetricamente. As

análises foram realizadas em triplicata ($n = 3$) e os resultados foram expressos como mg de NH_4^+ por L de amostra.

2.6 Análise estatística

Todos os resultados foram reportados como média \pm desvio padrão ($n = 3$). O teste de Shapiro-Wilk foi usado para verificar a normalidade dos dados e para analisar a homogeneidade de variâncias entre as amostras foram usados os testes de Fischer e de Levene. Para detectar diferenças significativas na contagem de microrganismos em placas, na quantificação de ácidos graxos voláteis de cadeia curta (AGVCC) e do íon amônio no tempo inicial e após as 24 horas da fermentação colônica *in vitro* e também para avaliar o efeito do controle e do extrato de uva no mesmo tempo, foi usado o teste *t* de Student e o teste de Wilcoxon para amostras pareadas. A análise de variância (ANOVA) e o teste Tukey para a comparação múltipla de médias foram usados para avaliar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos e a atividade antioxidante nas fases da digestão *in vitro* e na fermentação colônica *in vitro*. Para estabelecer a relação entre a quantificação dos diferentes compostos fenólicos e a atividade antioxidante com as fases da digestão e fermentação colônica foi usada a análise multivariada. Foram agrupadas as diferentes análises químicas (variáveis de resposta) e as fases da digestão (tratamentos) mediante Análise de Componentes Principais (ACP). Os dados foram estandardizados no intuito de que todas as variáveis tivessem a mesma influência sobre os resultados. As fases da digestão com teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante similares foram associadas mediante a análise de Agrupamento Hierárquico dos Componentes Principais (AHCP). As análises foram realizadas no programa *Statistica* 10.0 (StatSoft, Tulsa, EUA). As diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Também foi utilizado o *software* R versão 3.2.4 (Fundação R para a Computação Estatística, Viena, Áustria) e o *software* FactoMineR versão 1.32.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Bioacessibilidade dos compostos fenólicos e sua influência sobre a atividade antioxidante

Os teores de compostos fenólicos totais (CFT) e de antocianinas monoméricas (AM), assim como a atividade antioxidante (ABTS^{•+} e ORAC), foram monitorados no extrato bruto e durante as diferentes fases da digestão e fermentação colônica *in vitro* (Tabela 1). Elevados teores de CFT (4809,21 mg AGE. L⁻¹ extrato) e de AM (205,50 mg Mv3gl. L⁻¹ extrato) foram quantificados no extrato de casca de uva antes de ser submetido à digestão *in vitro* (extrato bruto) e não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) quando comparado com a amostra analisada após a digestão oral. Esse resultado poderia sugerir que na fase da digestão oral não acontece quebra da matriz (extrato líquido) pois o processamento da casca de uva para obtenção do extrato tornou bioacessíveis aos compostos fenólicos. Lingua *et al.* (2018) também reportaram que o teor de compostos fenólicos totais no vinho não mostrou diferenças significativas após a mastigação. Os autores atribuíram esse resultado ao fato de que os polifenóis contidos em amostras líquidas (vinho e extratos), diferente das matrizes sólidas (uvas), são bioacessíveis e prontos para exercer o efeito no trato gastrointestinal.

Uma elevada atividade antioxidante foi obtida no extrato bruto e na amostra digerida após a digestão oral por ambos os métodos (ABTS^{•+} e ORAC). A semelhança na tendência observada para os compostos bioativos e a atividade antioxidante (Tabela 1) poderia indicar

que os compostos fenólicos são os responsáveis pela atividade antioxidante no extrato bruto e após a digestão oral. Estudos prévios têm demonstrado que a elevada atividade antioxidante de diferentes variedades de uvas e vinhos está relacionada com o teor e perfil de compostos fenólicos, e está influenciada principalmente pelo elevado teor de antocianinas (Lingua *et al.*, 2016a; b). Yilmaz e Toledo (2004) reportaram que atividade sequestradora de radicais peroxila em extratos brutos de casca de uva foi devida principalmente à presença de catequina, epicatequina, ácido gálico e ácido elágico.

Tabela 1 Teores de compostos bioativos, bioacessibilidade e atividade antioxidante do extrato (bruto) líquido de casca de uva cv. Alicante Bouschet, após as diferentes fases da digestão e após a fermentação colônica *in vitro*

	Extrato bruto	Digestão oral	Digestão gástrica	Digestão intestinal (%B)	Fermentação colônica (%B)
CFT	4809,21 ± 79,87 b	3578,58 ± 21,96 b	2399,35 ± 43,78 c	2310,45 ± 97,87 d (48)	16182,26 ± 483,83 a (336)
AM	205,50 ± 5,12 b	215,81 ± 5,78 b	257,95 ± 8,44 a	59,12 ± 2,51 c (29)	ND
ABTS ^{•+}	24653,33 ± 305,50 c	19768,44 ± 1460,62 c	9627,54 ± 354,19 d	26581,27 ± 720,91 b	69420,96 ± 1311,28 a
ORAC	33420,59 ± 1191,69 d	34193,99 ± 454,72 d	52154,45 ± 2032,19 c	71304,91 ± 1415,09 b	238535,92 ± 1565,77 a

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n = 3), CFT: Compostos fenólicos totais (mg de ácido gálico equivalente [AGE]. L⁻¹ extrato), AM: Antocianinas monoméricas (mg de malvidina-3-O-glicosídeo [Mv3gl]. L⁻¹ extrato), ABTS^{•+}: Atividade sequestradora do radical catiônico (μmol equivalentes ao Trolox [ET]. L⁻¹ extrato), ORAC: Capacidade de absorção do radical oxigênio (μmol equivalentes ao Trolox [ET], L⁻¹ extrato). Extrato bruto: extrato de casca de uva antes de ser submetido a digestão. (%B): Bioacessibilidade. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas de acordo com o teste Tukey (p < 0,05).

Após a digestão gástrica houve uma diminuição do teor de CFT e um aumento no teor de AM (p < 0,05) quando comparados com o extrato bruto e a sua digestão oral. Tem sido reportado que as antocianinas são mais estáveis no pH ácido do estômago (pH = 2,5) onde predomina a forma do cátion *flavilium* (vermelho) (Lingua *et al.*, 2018). Após a fase de digestão intestinal foi observada uma diminuição (p < 0,05) dos teores de CFT e AM, constituindo 48% e 29% de fração bioacessível, respectivamente em relação ao teor encontrado no extrato bruto. O baixo teor de CFT obtido após a fase gástrica pode ser devido à maior bioacessibilidade dos compostos fenólicos na matriz líquida e ao estarem mais expostos, são mais susceptíveis à degradação. Por outro lado, Podsędek *et al.* (2014) reportaram que os compostos fenólicos como as antocianinas quando presentes em matrizes sólidas, são protegidos contra a degradação por outros componentes da matriz. A estabilidade dos compostos fenólicos, na matriz líquida, depende das propriedades físico-químicas de cada composto e da interação com os constituintes do meio gástrico e com outros componentes da própria matriz (Podsędek *et al.*, 2014; Lingua *et al.*, 2018). De acordo com Mcdougall *et al.* (2005), a co-digestão dos compostos fenólicos com outras substâncias presentes na matriz pode diminuir o teor de compostos fenólicos.

A transição da fase gástrica para a fase intestinal também causou uma diminuição considerável dos compostos fenólicos totais na digestão do vinho (Lingua *et al.*, 2018). Este comportamento tem sido associado às mudanças no pH, pois o elevado pH do intestino delgado (pH = 6,5) afeta os compostos fenólicos, principalmente as antocianinas, transformando o

cátion *flavilium* (vermelho) em base chalcona (incolor) (Pérez-Vicente *et al.*, 2002; McDougall *et al.*, 2005; Kuck *et al.*, 2017). As antocianinas não são detectadas após a fermentação colônica pelos métodos de análises (espectrofotométrico, nem por CLAE) porque, após serem biotransformadas, as antocianinas não retornam à forma do cátion *flavilium*. Outros compostos fenólicos de baixo peso molecular como ácidos fenólicos e aldeídos são formados após a degradação das antocianinas (Mosele *et al.*, 2015). Os produtos de degradação das antocianinas, dentre outros compostos, contribuem para o incremento significativo ($p < 0,05$) dos CFT após a fermentação colônica *in vitro* (Tabela 1).

A atividade antioxidante medida pelo método ABTS^{•+} foi significativamente ($p < 0,05$) menor na fase de digestão gástrica, porém foi observado um aumento da atividade antioxidante após as fases de digestão intestinal e a fermentação colônica com diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparado às fases anteriores da digestão (Tabela 1). Gião *et al.* (2012) reportaram que a diminuição da capacidade antioxidante medida por ABTS^{•+} na fase gástrica é devida à ação da pepsina, enzima presente no estômago, mais do que à influência do baixo pH do meio. Os autores consideram que essa enzima tem a capacidade de complexar os compostos antioxidantes que sequestram radicais ABTS^{•+}, o que poderia subestimar a atividade antioxidante após a fase gástrica. Segundo Dueñas *et al.* (2010), a atividade antioxidante quantificada pelo método ABTS^{•+} depende fortemente do pH, em condições alcalinas, desse modo, a atividade antioxidante aumenta no pH neutro do intestino. O resultado obtido neste trabalho confirma que, na fase gástrica, não resulta viável quantificar a atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+} e seria interessante testar outros métodos e suas possíveis interferências para fins de comparação.

Por outro lado, a atividade sequestradora dos radicais peroxila medida pelo ORAC aumentou significativamente ($p < 0,05$) após a digestão gástrica e após a digestão intestinal, sendo maior após a fermentação colônica *in vitro* em comparação com as fases anteriores e com o extrato bruto (Tabela 1). Este resultado pode ser justificado pela degradação dos compostos fenólicos originais presentes no extrato bruto como antocianinas e flavanóis em compostos de menor peso molecular (ácidos fenólicos) promovido pela microbiota colônica, que poderiam ser os responsáveis pela atividade antioxidante nesta fase. De acordo com Tagliazucchi *et al.* (2010) e Kamiloglu *et al.* (2015) a atividade antioxidante dos compostos fenólicos depende do pH e da sua estrutura química na fase da digestão onde é avaliada. O aumento da atividade sequestradora de radicais após a fase intestinal da digestão é devido provavelmente à desprotonação dos grupos hidroxila presentes no grupo aromático, durante a transição do meio ácido do estômago ao meio alcalino do intestino delgado (Bouayed *et al.*, 2011).

A análise do teor de compostos fenólicos totais não deve ser usada como único indicador das mudanças no teor desses compostos. Durante a digestão são liberados aminoácidos e purinas que também reagem com o reagente Folin Ciocalteu (Tagliazucchi *et al.*, 2010; Kamiloglu *et al.*, 2015). Essas substâncias e outras como açúcares residuais constituem interferências que poderiam superestimar o teor de compostos fenólicos totais tanto no material de partida quanto nas amostras digeridas. Embora Chandrasekara e Shahidi (2012) tenham comprovado que a influência dessas interferências é desprezível, a diferença entre as matrizes dificulta a generalização desse resultado. Por isso, os compostos fenólicos presentes no extrato bruto e nas amostras digeridas foram quantificados de forma individual por CLAE-DAD (Tabela 2).

As antocianinas monoméricas detectadas por CLAE-DAD sofreram degradação ao longo da digestão, sendo observadas diferenças significativas no teor desses compostos em cada fase da digestão, com exceção da digestão oral e gástrica, onde não houve diferenças significativas ($p < 0,05$). Após a digestão intestinal, somente foram detectadas as antocianinas

majoritárias do extrato bruto: os derivados glicosídicos e cumaroil-glicosídicos das agliconas malvidina e peonidina (Tabela 2).

A estabilidade das antocianinas está relacionada com a sua estrutura química. Os grupos hidroxila adjacentes à molécula são mais sensíveis à oxidação. Portanto a malvidina-3-*O*-glicosídeo e peonidina-3-*O*-glicosídeo, ao não possuir esses grupos hidroxila na posição orto, são mais resistentes à oxidação em comparação, por exemplo, à cianidina-3-*O*-glicosídeo (He *et al.*, 2012). Isto poderia justificar o fato de que a malvidina-3-*O*-glicosídeo e peonidina-3-*O*-glicosídeo sejam as únicas antocianinas monoglicosiladas detectadas após o processo de digestão *in vitro*. Como mencionado anteriormente, no pH neutro do intestino delgado, as antocianinas podem ser metabolizadas em formas não coloridas ou degradadas em outros compostos, o que poderia ser a causa das elevadas perdas de antocianinas (77%) observadas após a digestão intestinal.

Segundo He *et al.* (2012), a acilação pode aumentar tanto a estabilidade quanto a solubilidade das antocianinas. Neste estudo, as antocianinas monoaciladas com ácido-*p*-cumárico (malvidina-3-*O*-(6-*O-p*-cumaroil)-glicosídeo e peonidina-3-*O*-(6-*O-p*-cumaroil)-glicosídeo) também foram detectadas após a digestão intestinal *in vitro*. McDougall *et al.* (2007) determinaram a estabilidade das antocianinas do repolho roxo sob condições gastrointestinais simuladas e também encontraram que as antocianinas monoaciladas com ácido-*p*-cumárico mostraram maior estabilidade em comparação com as outras antocianinas aciladas presentes no repolho roxo. Os autores sugeriram que o tipo de acilação pode influenciar na estabilidade das antocianinas durante a digestão. Estudos anteriores também confirmaram a maior estabilidade das formas aciladas em pH neutros (Malien-Aubert *et al.*, 2001; Stintzing *et al.*, 2002).

Após a digestão *in vitro*, somente 23% do total de antocianinas monoméricas quantificadas por CLAE-DAD no extrato bruto encontram-se bioacessíveis para ser utilizadas como substrato da microbiota na fase de fermentação colônica *in vitro*. Após a fase de fermentação, as antocianinas não foram detectadas (Tabela 2).

Segundo Fleschhut *et al.* (2006), a hidrólise das antocianinas pelas bactérias da microbiota começa com a clivagem da porção do açúcar (deglicosilação), levando a formação da aglicona da antocianina. As agliconas são muito instáveis quando expostas as variações do pH no intestino, pelo que podem mudar de forma espontânea e formar bases quinoidais, que se decompõem em ácido fenólico e aldeído. Tem sido reportado que os principais produtos da degradação das antocianinas pela microbiota intestinal são: ácidos siríngico e gálico a partir da malvidina-3-glicosídeo e os ácidos vanílico e protocatecuico a partir da peonidina-3-glicosídeo (Cueva *et al.*, 2017). Também os ácidos gálico e protocatecuico têm sido reportados como metabólitos finais da degradação da delfinidina-3-glicosídeo e cianidina-3-glicosídeo, respectivamente (Mosele *et al.*, 2015).

Dentre os compostos fenólicos detectados por CLAE-DAD, os monômeros de flavanóis: (+)-catequina e (-)-epicatequina não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) em comparação com o teor encontrado no extrato bruto e nas fases oral e gástrica. Porém, após a digestão intestinal foi observada uma diminuição significativa ($p < 0,05$) desses compostos, que não foram detectados após a fermentação colônica, semelhante as antocianinas. Os monômeros de flavanóis são amplamente metabolizados pela microbiota do cólon, dentre os metabólitos encontram-se o ácido vanílico e o ácido gálico, dentre outros ácidos fenólicos (Cueva *et al.*, 2017).

Tabela 2 Teores de compostos fenólicos (mg/L extrato) no extrato (bruto) líquido de casca de uva cv. Alicante Bouschet de casca de uva e nas amostras digeridas após as diferentes fases da digestão e após a fermentação colônica *in vitro*

Compostos	Extrato bruto	Digestão oral	Digestão gástrica	Digestão intestinal (%B)	Fermentação colônica (%B)
<i>Antocianinas</i>					
Delfinidina-3-glc	1,00 ± 0,01	ND	ND	ND	ND
Cianidina-3-glc	2,4 ± 0,01 a	1,52 ± 0,03 b	ND	ND	ND
Petunidina-3-glc	2,20 ± 0,02 a	1,52 ± 0,02 b	ND	ND	ND
Peonidina-3-glc	59,10 ± 1,50 a	27,67 ± 0,29 b	28,56 ± 0,01 b	19,25 ± 0,69 c (33)	ND
Malvidina-3-glc	84,30 ± 1,90 a	39,33 ± 0,29 b	40,50 ± 0,50 b	25,60 ± 1,03 c (30)	ND
Σ Picos 6 ao 22	61,50 ± 0,30 a	22,83 ± 1,26 b	24,29 ± 1,43 b	NQ	ND
Peonidina-3-cmglc	52,40 ± 1,20 a	22,13 ± 0,15 b	22,38 ± 0,82 b	13,69 ± 1,03 c (26)	ND
Malvidina-3-cmglc	128,60 ± 3,60 a	52,50 ± 0,50 b	50,64 ± 0,72 b	30,95 ± 1,03 c (24)	ND
Σ Picos 25 ao 27	4,20 ± 0,01	ND	ND	ND	ND
Total	395,70	167,50	166,37	89,49 (23)	ND
<i>Flavanóis</i>					
(+)-Catequina	38,80 ± 2,86 a	37,05 ± 2,48 ab	33,45 ± 0,63 b	10,21 ± 1,03 c (26)	ND
(-)-Epicatequina	23,87 ± 2,02 a	22,11 ± 0,18 a	21,58 ± 0,18 a	5,52 ± 0,60 b (23)	ND
Total	62,67	59,16	55,03	15,73 (25)	ND
<i>Ácidos fenólicos</i>					
Ácido gálico	11,80 ± 0,20 c	12,22 ± 0,32 c	13,81 ± 0,13 c	22,40 ± 0,22 b (190)	540,57 ± 2,83 a (4581)
Ácido protocatecuico	5,77 ± 0,15 b	5,76 ± 0,05 b	5,52 ± 0,12 b	6,12 ± 0,15 b (106)	23,05 ± 0,45 a (399)
Ácido vanílico	44,57 ± 1,80 a	40,71 ± 1,01 b	39,94 ± 0,15 b	46,14 ± 0,65 a (104)	26,71 ± 1,36 c (60)
Ácido siríntrico	11,60 ± 0,10 c	12,07 ± 0,49 c	12,23 ± 0,21 c	16,12 ± 0,21 b (139)	20,43 ± 2,72 a (176)
Ácido elágico	2,00 ± 0,10 a	1,63 ± 0,23 b	1,03 ± 0,06 c	1,19 ± 0,04 c (60)	ND
Total	75,74	72,39	72,53	91,97 (121)	610,76 (806)

Valores expressos como mg do composto. L⁻¹ extrato e reportados como média ± desvio padrão (*n* = 3). Antocianinas monoméricas foram quantificadas como malvidina-3-glc; flavanóis e ácidos fenólicos foram quantificados com padrões analíticos de cada composto. glc: glicosídeo; cm: cumaroil. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre as fases da digestão e fermentação colônica *in vitro* de acordo com o teste Tukey (*p* < 0,05). Extrato bruto: extrato líquido de casca de uva antes de ser submetido à digestão *in vitro*. (%B): Bioacessibilidade

Os ácidos hidroxibenzoicos predominaram na composição do extrato bruto. Os teores dos ácidos gálico e siríngico nas fases de digestão oral e gástrica não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) em comparação com o extrato bruto. Após a digestão intestinal houve um aumento significativo ($p < 0,05$) nos teores dos ácidos gálico, vanílico e siríngico, provavelmente devido à degradação das antocianinas. A bioacessibilidade desses ácidos no intestino delgado foi: ácido gálico (190%), ácido vanílico (104%) e ácido siríngico (139%).

O teor do ácido vanílico aumentou ($p < 0,05$) após a digestão intestinal em comparação com as fases da digestão oral e gástrica, e não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação ao extrato bruto, sendo 104% desse composto bioacessível para ser metabolizado na fermentação colônica *in vitro*. O ácido elágico, derivado dimérico do ácido gálico, foi diminuindo durante a digestão, porém não foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) na digestão intestinal em comparação a digestão gástrica. Desse modo, 60% desse composto permaneceu bioacessível para ser utilizado na fermentação colônica *in vitro*.

Os teores dos ácidos gálico, protocatecuico e siríngico aumentaram significativamente ($p < 0,05$) após a fermentação colônica; provavelmente devido a que esses ácidos têm sido identificados como metabólitos derivados da degradação das antocianinas pela microbiota intestinal. Os teores dos ácidos gálico e protocatecuico mostraram o maior incremento após fermentação colônica, provavelmente por também serem produtos da degradação dos flavanóis (Mosele *et al.*, 2015; Cueva *et al.*, 2017). Os resultados indicam que esses ácidos fenólicos, principalmente o ácido gálico poderia ser o responsável pelo aumento da atividade antioxidante após a digestão intestinal e a fermentação colônica *in vitro*.

Pelo contrário, foi observada uma diminuição significativa ($p < 0,05$) do teor do ácido vanílico após a fermentação colônica em comparação com o extrato bruto e as fases anteriores da digestão. O ácido vanílico pode sofrer demetilação dando como resultado ácido protocatecuico (Mosele *et al.*, 2015; Cueva *et al.*, 2017), o que poderia justificar o aumento deste ácido após a fermentação colônica. O ácido elágico não foi detectado após a fermentação colônica, devido a sua rápida metabolização pela microbiota intestinal (Landete, 2011). Estudos sugerem que, após o consumo de vinho, o perfil fenólico das fezes está composto majoritariamente por ácidos fenólicos e outros metabólitos derivados dos flavanóis, antocianinas e flavonóis, principais classes de polifenóis presentes no vinho (Muñoz-González *et al.*, 2013; Jiménez-Girón *et al.*, 2014).

3.2 Correlação, Análise de Componentes Principais (ACP) e Agrupamento Hierárquico dos Componentes Principais (AHCP)

Na Figura 1 observa-se o correlograma que representa as correlações significativas ($p < 0,05$) entre os compostos fenólicos, sejam quantificados de forma individual ou total e também a correlação de cada um deles com a atividade antioxidante. Os métodos para análise de compostos fenólicos, tanto o método espectrofotométrico quanto o método cromatográfico mostraram uma correlação positiva muito forte ($r > 0,95$) entre eles e com atividade antioxidante. Também, os ácidos gálico, siríngico e protocatecuico apresentam uma forte correlação positiva ($r = 0,89$) entre eles e todos apresentam uma correlação muito forte ($r > 0,90$) com a atividade antioxidante medida por ABTS^{•+} e ORAC como foi representado pelos componentes principais 1 e 2 na Figura 2a. Esse resultado poderia estar relacionado com o aumento dos teores dos ácidos fenólicos, principais produtos da degradação das antocianinas e flavanóis, que conseqüentemente contribui para o aumento da atividade antioxidante após da digestão e a fermentação colônica *in vitro*.

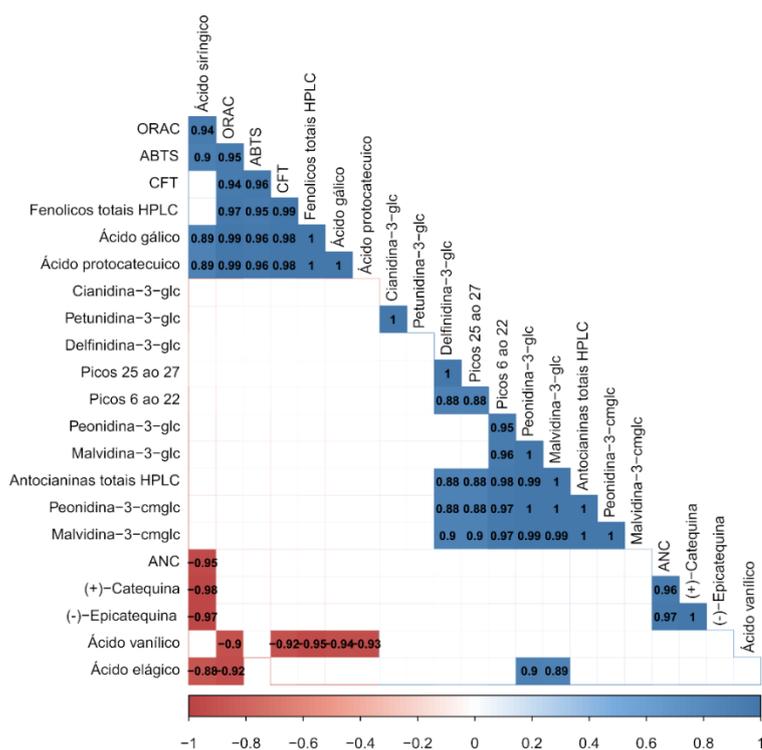


Figura 1 Correlograma entre os teores de compostos bioativos e a atividade antioxidante. Correlações significativas ($p < 0,05$): positivas (azul) e negativas (vermelho) de acordo com o teste de correlação linear de Pearson

Da mesma forma, os métodos que quantificam a atividade antioxidante estão fortemente correlacionados entre si ($r = 0,95$). As antocianinas majoritárias (derivadas aciladas e monoglicosiladas da malvidina e peonidina) também apresentaram correlação positiva muito forte ($r > 0,99$) entre elas e com método de análise de antocianinas monoméricas por CLAE-DAD como foi representado na Figura 2a. Por outro lado, o ácido elágico possui uma correlação negativa muito forte com a atividade antioxidante medida por ORAC ($r = -0,92$), provavelmente porque a degradação do ácido elágico pela microbiota intestinal produz metabólitos chamados urolitinas. Segundo Piwowarski *et al.* (2014), as urolitinas possuem atividade sequestradora de radicais livres, como consequência dos grupos hidroxila presentes na sua estrutura. Quanto mais grupos hidroxila livres, maior inibição da liberação de espécies reativas de oxigênio. A presença de urolitinas poderia justificar o aumento da atividade antioxidante medida por ORAC, principalmente após a fase de fermentação colônica. O teor de AM quantificado pelo método do pH diferencial possui uma correlação negativa muito forte com o ácido siríngico ($r = -0,95$). Esse comportamento poderia se derivar de que a degradação das antocianinas como as derivadas da malvidina (majoritárias no extrato) resulta no aumento do teor do ácido siríngico.

Os componentes principais 1 e 2 que aparecem representados na Figura 2a e b explicaram 92,5% da variabilidade total dos resultados. Os resultados indicam que o extrato bruto apresentou uma maior concentração de antocianinas monoméricas que foram se degradando ao longo da digestão *in vitro* e, conseqüentemente, contribuíram para o incremento dos teores dos ácidos fenólicos e o aumento da atividade antioxidante após a fermentação colônica *in vitro* (Figura 2b). A partir da ACP, foi realizada a análise de agrupamentos AHCP que sugere a presença de 3 grupos definidos como aparece na Figura 2c. O primeiro grupo (*cluster 1*) consiste no extrato bruto, o segundo grupo (*cluster 2*) agrupa as fases da digestão (oral, gástrica

e intestinal) e o terceiro grupo (*cluster 3*) compreende a fase de fermentação colônica. Esse agrupamento sugere pouca variação dos teores dos compostos fenólicos nas fases de digestão oral e gástrica, provavelmente devido à natureza da matriz que é um extrato líquido e os compostos são bioacessíveis. Os teores dos flavanóis e das antocianinas diminuíram de forma significativa após a digestão intestinal, que foi representada um pouco afastada das fases anteriores, mas dentro do mesmo *cluster 2*. Finalmente, a fase de fermentação colônica aparece representada pelo *cluster 3*, como sendo a fase de maior biotransformação dos compostos fenólicos do extrato pela microbiota.

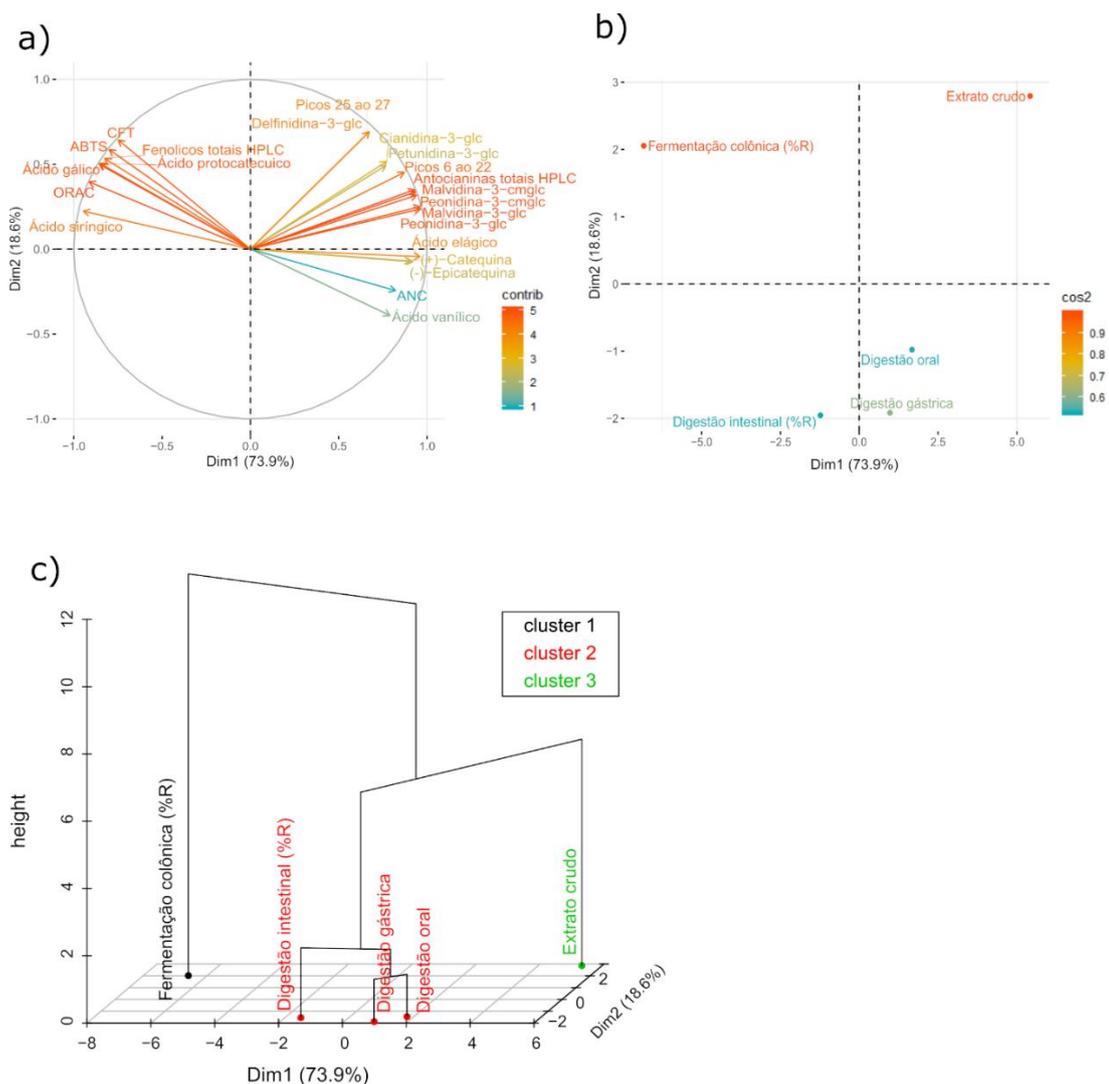


Figura 2 Análise de Componentes Principais (ACP): (a) em função das variáveis de resposta (análises de compostos bioativos e atividade antioxidante), (b) em função dos tratamentos (fases da digestão e fermentação colônica *in vitro*) e (c) Agrupamento Hierárquico dos Componentes Principais (AHCP)

3.3 Efeito do extrato líquido de casca de uva nos microrganismos da microbiota intestinal

A contagem de colônias em placas constitui um resultado preliminar importante para avaliar as mudanças na modulação da microbiota intestinal como consequência da fermentação do extrato líquido de casca de uva. Os microrganismos utilizados como representantes da

microbiota intestinal foram os grupos *Clostridium* spp. e Coliformes a 35 °C, como bactérias patogênicas e por outro lado, os grupos *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. como bactérias benéficas para o hospedeiro assim como estudado por Tzounis *et al.* (2008), Hidalgo *et al.* (2012), Cueva *et al.* (2013), Guergoletto *et al.* (2016) e Gil-Sánchez *et al.* (2018). A influência do extrato líquido de casca de uva nesses microrganismos pode ser observada na Tabela 3 que lista a contagem de colônias formadas no início (t = 0 h) e no final do experimento (t = 24 h).

Após as 24 h da fermentação colônica *in vitro*, tanto no extrato de casca de uva quanto na amostra controle, foi observado um incremento significativo ($p < 0,05$) no número de *Clostridium* spp. quando comparado com o tempo zero. A amostra de extrato de uva teve um aumento de 1,69 log de *Clostridium* spp., enquanto a amostra controle (1,55 log) após transcorridas 24h. A contagem de Coliformes a 35 °C também apresentou um incremento significativo ($p < 0,05$), no controle e no extrato de uva. Porém, no extrato de uva a contagem aumentou 0,62 log, enquanto no controle o aumento foi de 1,45 log após 24 horas de fermentação.

O número de *Lactobacillus* spp. aumentou significativamente ($p < 0,05$) ao final da fermentação comparado com o tempo zero, tanto na amostra controle quanto no extrato de uva. Apesar de que, o maior aumento (1,56 log) foi observado na amostra de extrato de uva, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) em comparação com o controle (1,23 log). Por outro lado, não foram detectadas diferenças significativas ($p > 0,05$) no número de *Bifidobacterium* spp. após a fermentação do extrato de casca de uva nem da amostra controle ao se comparar os tempos avaliados. Um aumento de 0,24 log foi observado após 24 horas da fermentação do extrato de uva em comparação com 0,15 log para a amostra controle. No entanto, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) ao se comparar a contagem dos microrganismos após a fermentação do controle ou do extrato de casca de uva nos tempos avaliados.

Os resultados indicam que a multiplicação das bactérias representativas da microbiota não pode ser atribuída à adição do extrato líquido de casca da uva ao meio alimentar, pelo menos no tempo avaliado neste estudo (24 horas) de fermentação colônica *in vitro*, uma vez que o comportamento foi semelhante ao da amostra controle. Outros experimentos são necessários para avaliar o efeito deste extrato na microbiota durante tempos maiores de fermentação *in vitro*.

3.4 Influência do extrato de casca de uva sobre a atividade da microbiota intestinal

A atividade fermentativa foi monitorada por meio da identificação e quantificação dos ácidos graxos voláteis de cadeia curta (AGVCC) e a atividade proteolítica pela avaliação da produção do íon amônio. Os AGVCC e o íon amônio são produtos da fermentação dos açúcares e da proteólise, respectivamente. Os níveis destes metabólitos são considerados indicadores da modulação da população microbiana no intestino grosso. Por exemplo, o gênero *Lactobacillus* é classificado como sacarolítico e, como consequência, produz grandes quantidades de AGVCC (Macfarlane, 1991). *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* produzem ácido lático que é utilizado por outras bactérias como algumas espécies de *Clostridium* para a produção de ácido butírico (Louis e Flint, 2009) e por outros grupos de microrganismos que habitam o intestino, para a produção de ácido propiônico (Salazar *et al.*, 2008). Por outro lado, um aumento nos teores dos AGVCC diminui o pH no intestino, o que permite o crescimento de bactérias benéficas como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.

Tabela 3 Contagem em placas das colônias dos microrganismos representativos da microbiota intestinal no tempo inicial (t = 0 h) e após 24 h da fermentação *in vitro* do extrato de casca de uva e do controle (amostra sem extrato de uva)

Microrganismos	Tempo (h)	Controle	Extrato de uva
<i>Clostridium</i> spp.	0	7,07 ± 0,11 Ba	7,13 ± 0,03 Ba
	24	8,62 ± 0,21 Aa	8,82 ± 0,07 Aa
Coliformes a 35 °C	0	5,30 ± 0,00 Ba	5,86 ± 0,14 Ba
	24	6,75 ± 0,05 Aa	6,48 ± 0,25 Aa
<i>Lactobacillus</i> spp.	0	6,81 ± 0,29 Ba	6,99 ± 0,01 Ba
	24	8,04 ± 0,08 Aa	8,55 ± 0,37 Aa
<i>Bifidobacterium</i> spp.	0	4,27 ± 0,71 Aa	4,21 ± 0,14 Aa
	24	4,12 ± 0,63 Aa	4,45 ± 0,10 Aa

Valores reportados como média (log UFC.mL⁻¹) ± desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre o controle e o extrato de casca de uva no mesmo tempo de acordo com o teste *t* de Student para amostras pareadas (*p* < 0,05). Letras minúsculas diferentes em itálico na mesma linha indicam diferenças significativas entre o controle e o extrato de casca de uva no mesmo tempo de acordo com o teste Wilcoxon para amostras pareadas (*p* < 0,05). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tempos ao avaliar por separado o controle ou o extrato de casca de uva de acordo com o teste *t* de Student para amostras pareadas (*p* < 0,05).

A Tabela 4 lista o perfil de AGVCC após 24 horas da fermentação do controle e do extrato de casca de uva. Nas amostras coletadas no tempo inicial da fermentação colônica (t = 0 h) não foram detectados AGVCC o que indica que não houve produção destes metabólitos e, portanto, pouca atividade fermentativa da microbiota intestinal. Porém, após 24 horas da fermentação do extrato de casca de uva foi observado um aumento significativo da produção de AGVCC em comparação ao controle. Um aumento significativo (*p* < 0,05) foi observado na concentração de ácido acético após 24 h de fermentação do extrato de casca de uva em comparação com o controle (Tabela 4). Os ácidos propiônico e butírico não foram detectados no controle após 24 horas de fermentação. Porém, foi quantificado o ácido propiônico em baixas concentrações (0,87 mmol.L⁻¹) e o ácido butírico foi detectado em quantidade de traços após 24 h de fermentação do extrato de casca de uva. Esses resultados indicam que a adição do extrato líquido de casca de uva ao meio alimentar favoreceu a atividade fermentativa da microbiota intestinal. Porém, o efeito prebiótico que resulte na modulação e multiplicação dos microrganismos da microbiota intestinal somente poderá ser alcançado em longo prazo.

A produção de ácido acético e propiônico acontece após a degradação dos carboidratos pelas bactérias do intestino. O grupo *Bifidobacterium* spp. produz ácido acético principalmente por ação da enzima fructose-6-fosfato cetolase sobre os carboidratos, pelo que o incremento na produção deste ácido poderia ser indicativo da multiplicação desta bactéria (Miller e Wolin, 1996). De fato, após a fermentação do extrato de uva, houve maior produção de ácido acético juntamente com o incremento do número de *Bifidobacterium* spp, mesmo sem que houvesse diferença significativa (*p* > 0,05) entre o extrato de uva e o controle.

Tabela 4 Ácidos graxos voláteis de cadeia curta (AGVCC) após 24 h da fermentação colônica *in vitro*

AGVCC	Concentração (mmol.L ⁻¹)	
	Controle	Extrato de uva
Ácido acético	1,95 ± 0,13 b	16,72 ± 0,18 a
Ácido propiônico	ND	0,87 ± 0,01
Ácido butírico	ND	tr

Valores expressos como média ± desvio padrão ($n = 4$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre o controle e o extrato de uva para um mesmo ácido graxo volátil de cadeia curta de acordo com o teste t de Student para amostras pareadas ($p < 0,05$). ND: não detectado. tr: traços.

Por outro lado, o ácido propiônico pode ser produzido por *Clostridium* spp. que reduz o piruvato, produto final da glicólise, a lactato, por ação da enzima lactato desidrogenase (Hosseini *et al.*, 2011). A produção de ácido propiônico após a fermentação do extrato de casca de uva poderia justificar a presença do grupo *Clostridium* spp. Tem sido reportado que os ácidos acético e propiônico, detectados no presente estudo, influem na regulação do apetite, incrementando a saciedade e reduzindo a ingestão de alimentos (Arora *et al.*, 2011; Tolhurst *et al.*, 2012; Reichardt *et al.*, 2014). Também o ácido acético está relacionado com o controle da inflamação e nas defesas contra patógenos, o que resulta em benefícios para o hospedeiro (Russell *et al.*, 2013).

Teores de ácido acético similares aos obtidos neste estudo foram reportados por Guergoletto *et al.* (2016) após 24 horas da fermentação *in vitro* de polpa de juçara liofilizada usando um modelo estático. Por outro lado, a fermentação da juçara resultou em maiores concentrações de ácido propiônico e butírico que as reportadas neste estudo para o extrato de casca de uva. Essas diferenças devem-se à diferente composição entre as matrizes, neste caso, a polpa liofilizada de juçara e o extrato líquido de casca de uva. Após o processo digestivo, foi reportado que a polpa de juçara ainda apresenta substratos (açúcares e fibras) que poderiam ser fermentados pela microbiota intestinal (Guergoletto *et al.*, 2016). Quando o material de partida é a polpa da fruta liofilizada, espera-se que os açúcares e fibras estejam em maiores concentrações, em comparação ao extrato aquoso de casca de uva (subproduto da vinificação) onde, embora permaneçam açúcares residuais, a maioria foi fermentado pelas leveduras na elaboração do vinho.

Martín-Carrón e Goni (1998) demonstraram que a ingestão de ração contendo cascas de uvas tintas aumentou a capacidade fermentativa da microbiota do intestino de ratos machos Wistar. Foi observado um aumento significativo de AGVCC (acético, propiônico e butírico) comparado com o controle após 24 horas de fermentação. Além disso, a produção de AGVCC foi significativamente correlacionada com os valores de pH ($r = -0,969$) e produção de gás ($r = 0,960$). Recentemente, Gil-Sánchez *et al.* (2018) avaliaram a fermentação *in vitro* de extratos de bagaço de uva usando um simulador dinâmico de digestão gastrointestinal (Simgi[®]). Os autores observaram um aumento significativo na produção de AGVCC pela microbiota intestinal de dois indivíduos diferentes durante a ingestão contínua dos extratos de bagaço de uva.

A amônia é um metabólito tóxico produzido a partir da degradação das proteínas pelas bactérias da microbiota intestinal. Dentre as espécies proteolíticas encontra-se o *Clostridium* spp. que também pode fermentar os carboidratos (Riley, 2012), sendo seu crescimento

dependente do substrato no meio alimentar (Nyangale *et al.*, 2014). Por isso estas espécies, são as mais numerosas no intestino, pois quando o carboidrato está esgotado utilizam os aminoácidos como substrato para geração de energia metabólica (Richardson *et al.*, 2013). O grupo *Clostridium* spp. constitui um dos maiores contribuintes para a produção de amônia (Vince e Burridge, 1980), metabólito prejudicial por ter sido reconhecido como possível agente etiológico do câncer no intestino grosso (Wrong e Vince, 1984) e responsável por sintomas de intoxicação cerebral na síndrome de encefalopatia portossistêmica (Vince e Burridge, 1980). Essa espécie também produz toxinas associadas a doenças crônicas inflamatórias do intestino e problemas imunológicos (Dueñas *et al.*, 2015).

A produção de íons amônio foi baixa após 24 horas de fermentação, sendo gerados $10,05 \pm 0,07$ mg NH_4^+ . L^{-1} em comparação com $12,60 \pm 1,41$ mg NH_4^+ . L^{-1} gerados no início da fermentação. Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre esses valores. Esse resultado pode ser relacionado com uma preferência do gênero *Clostridium* spp. pela utilização de carboidratos do que proteínas como fonte de energia. Tem sido demonstrado por Vince e Burridge (1980) que as bactérias Gram negativas anaeróbicas como o gênero *Clostridium* spp. produzem menos amônia a baixo pH. Por outro lado, o incremento de *Lactobacillus* spp. pode favorecer a diminuição do pH no meio devido essa espécie produzir ácido lático como produto final da fermentação (Ibrahim, 2016). Portanto, sugere-se que a baixa produção de amônia se relacione com o concomitante incremento na multiplicação de *Lactobacillus* spp. e de *Clostridium* spp. após a fermentação do extrato de casca de uva. Esses fatos em conjunto poderiam constituir uma evidencia do sinergismo entre os microrganismos da microbiota intestinal e a manutenção do equilíbrio saudável do hospedeiro.

A diminuição dos teores dos compostos fenólicos majoritários do extrato bruto de casca de uva (antocianinas e flavanóis) e o incremento nos teores dos ácidos gálico e siríngico, após a digestão *in vitro* sugerem que estes últimos são bioacessíveis e constituem fontes de carbono e energia para a microbiota intestinal. Apesar de que 24 horas de fermentação colônica *in vitro* não foram suficientes para estimular a multiplicação dos microrganismos, o aumento na produção de AGVCC e a baixa produção de amônio sugerem que o extrato de casca de uva favoreceu a atividade metabólica da microbiota intestinal. Dessa forma, conclui-se que o extrato líquido concentrado de casca de uva poderia ter um efeito prebiótico potencial para a modulação da microbiota em longo prazo.

CAPÍTULO IV

ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS ANTOCIANINAS E DA COR DURANTE A ESTOCAGEM DE UM PREPARADO DE FRUTAS VERMELHAS COM EXTRATO CONCENTRADO DE CASCA DE UVA CV. ALICANTE BOUSCHET (*VITIS VINIFERA* L.) E DE UM SORVETE ADICIONADO DESTE PREPARADO

RESUMO

Extratos de cascas de uvas são particularmente ricos em antocianinas, que são pigmentos responsáveis pelas cores intensas de muitos frutos. As temperaturas elevadas usadas para esterilizar alimentos à base de frutas produzem perdas consideráveis de antocianinas e degradação da cor, o que resulta em perda da qualidade. Os objetivos do presente trabalho foram elaborar um preparado de frutas vermelhas adicionado de um extrato líquido concentrado de casca de uva cv. Alicante Bouschet (*Vitis vinifera* L.) e um sorvete adicionado deste preparado como corante e saborizante, avaliar a estabilidade das antocianinas monoméricas e da cor destes produtos após os processos de elaboração e durante 60 dias de estocagem e avaliar a aceitação sensorial de sorvetes adicionados do preparado de frutas vermelhas com e sem adição de extrato de casca de uva usando uma escala hedônica de 9 pontos. A identificação e quantificação das antocianinas foi realizada por Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) e os parâmetros de cor foram avaliados mediante colorimetria triestímulos. Os resultados indicaram que o processo de esterilização provocou perdas de 91% no teor de antocianinas monoméricas totais, não sendo apropriado para esterilizar o preparado de frutas vermelhas. Apesar da diminuição do teor de antocianinas, a cor se manteve estável durante a estocagem no preparado de frutas vermelhas e no sorvete, provavelmente devido à presença de pigmentos avermelhados derivados das antocianinas. Ambos os sorvetes tiveram boa aceitação na avaliação sensorial, sendo que a cor do sorvete com preparado de frutas vermelhas adicionado de extrato de casca de uva obteve maior aceitabilidade. Portanto, o extrato poderia ser usado como corante natural em preparados de frutas vermelhas para adição em sorvetes, entre outros produtos.

Palavras-chave: extrato de casca de uva, Alicante Bouschet, preparado de frutas vermelhas, sorvete, estabilidade, antocianinas, cor

ABSTRACT

Grape skin extracts are particularly rich in anthocyanins, which are pigments responsible for the intense colors of many fruits. The high temperatures used to sterilize fruit-based foods produce considerable losses of anthocyanins and the color degradation, which results in loss of quality. In this work, was obtain a concentrated liquid extract from cv. Alicante Bouschet (*Vitis vinifera* L.) which was added as a dye in a red berries preparation that was added to ice cream. The stability of the monomeric anthocyanins and the color of these products were evaluated after the elaboration processes and during 60 days of storage. Sensory acceptance of ice creams added with red berries preparation with and without added liquid extract of grape skin was evaluated by using a 9-point hedonic scale. Monomeric anthocyanins were analyzed by high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) and the color parameters were evaluated by tristimulus colorimetry. The sterilization process caused 91% losses in total monomeric anthocyanins content and was not suitable for sterilization of the red berries preparation. Despite the decrease in anthocyanin content, the color remained stable during storage in the red fruit preparation and in the ice cream, probably due to the presence of reddish pigments derived from anthocyanins. Both ice creams were well accepted by the consumers, however, the color of the ice cream added with red berries preparation and grape skin extract obtained better acceptability. Therefore, the extract can be used as a natural dye in red berries preparations for addition in ice cream, among other products.

Keywords: concentrated liquid extract, Alicante Bouschet, grape skin, red berries preparation, ice cream, stability, anthocyanins, cor

1 INTRODUÇÃO

A cor é uma das propriedades mais importantes dos alimentos, sendo a primeira característica a ser percebida e julgada pelos consumidores para avaliar a qualidade do alimento e a sua aceitabilidade (Giusti e Wrolstad, 2003; Schwartz *et al.*, 2010; Pathare *et al.*, 2013). Os corantes são substâncias de origem natural ou sintética adicionados aos alimentos para realçar, restaurar e padronizar a cor e aparência dos alimentos, transformando-os em opções mais atrativas para os consumidores (Pasiás *et al.*, 2015). O uso dos corantes sintéticos tem diversas vantagens para a sua aplicação na indústria: são mais baratos e fáceis de produzir que os corantes naturais e apresentam maior estabilidade química sob as condições de processamento e estocagem, sem transmitir odor ou sabor aos produtos. No entanto, evidências científicas relatam efeitos prejudiciais para a saúde associados aos corantes sintéticos dependendo da dose utilizada (Carocho *et al.*, 2015; Feketea e Tsabouri, 2017).

Nesse cenário, a preferência dos consumidores por alimentos adicionados de corantes naturais é cada vez crescente, pois são geralmente percebidos como mais saudáveis e seguros. Isto conjuntamente com as restrições legais à utilização de determinados corantes sintéticos como os do tipo *azo*, tem incentivado a indústria alimentar a procurar novas fontes naturais para a obtenção de novos corantes (Carocho *et al.*, 2015). As antocianinas são pigmentos responsáveis pelas cores intensas de muitos frutos como a uva, e também pela cor dos vinhos e seus subprodutos. Extratos de cascas de uvas são particularmente ricos nestes pigmentos e são conhecidos como enocianina (E163) (Giusti e Wrolstad, 2003), sendo usados para conferir tons de vermelho em refrigerantes, produtos de confeitaria e preparações de frutas (Carocho *et al.*, 2015).

O uso das antocianinas como corantes em alimentos é limitado pela instabilidade desses compostos. Vários trabalhos estudam a influência das elevadas temperaturas aplicadas no processamento e estocagem na estabilidade das antocianinas e da cor em formulações de alimentos à base de fruta (Wang e Xu, 2007; Patras *et al.*, 2011; Hernández-Herrero e Frutos, 2014; Wang *et al.*, 2015; You *et al.*, 2018). As elevadas temperaturas usadas para esterilizar esses produtos e inativar as enzimas produzem perdas consideráveis de antocianinas e consequentemente a degradação da cor, que resulta em perda da qualidade (You *et al.*, 2018). A identificação e quantificação das antocianinas individuais por CLAE-DAD e a avaliação dos parâmetros de cor usando a colorimetria triestímulos constituem ferramentas que permitem monitorar as mudanças na concentração desses pigmentos após o processamento e durante a estocagem dos produtos (Wrolstad *et al.*, 2005).

A estabilidade térmica depende da concentração e estrutura química dos pigmentos e também da composição da matriz (Giusti e Wrolstad, 2003; Fournier-Level *et al.*, 2011; Han e Xu, 2015; Tang *et al.*, 2017). As reações de condensação entre as antocianinas e a copigmentação das antocianinas com outros compostos fenólicos (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009) como também as reações de condensação com outros compostos da matriz alimentar contribuem para a formação de outros pigmentos derivados que mantêm a coloração vermelha dos alimentos durante a estocagem (Es-Safi *et al.*, 2000; 2002).

O sorvete é um dos produtos lácteos mais consumidos no mundo, e é geralmente pobre em antioxidantes naturais. Assim, é interessante explorar a possibilidade de melhorar os atributos nutricionais do sorvete usando ingredientes com benefícios para a saúde, com foco em antioxidantes naturais e agentes corantes naturais em substituição aos aditivos sintéticos (Marshall *et al.*, 2012).

Os objetivos do presente estudo foram elaborar um preparado de frutas vermelhas adicionado de extrato líquido concentrado de casca de uva e um sorvete adicionado do preparado de frutas como corante e saborizante, determinar o efeito do processo de esterilização e do tempo de estocagem na estabilidade das antocianinas monoméricas e da cor do preparado de frutas esterilizado armazenado a 25 °C, bem como a estabilidade das antocianinas monoméricas e da cor do sorvete a -18 °C, durante 60 dias. Também, avaliar a aceitação sensorial de sorvetes adicionados de preparado de frutas vermelhas com e sem adição do extrato líquido concentrado de casca de uva cv. Alicante Bouschet.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Os ingredientes do sorvete base ou “calda” foram: emulsificante Emustab[®], estabilizante Liga Neutra Extra[®], leite em pó Ninho[®], creme de leite Nestlé[®] e açúcar refinado União[®]. Para elaboração do preparado de frutas vermelhas foram utilizadas frutas vermelhas congeladas morango e amora (DeMarchi[®]) comprados no mercado local do Rio de Janeiro, RJ/Brasil.

A casca de uva da variedade Alicante Bouschet, proveniente da produção de vinho tinto, foi fornecida pela vinícola Rio Sol, do grupo ViniBrasil (Lagoa Grande, PE, Brasil). Para obtenção do extrato de casca de uva, foram usados etanol absoluto P.A. (Emplura[®], Merck, Alemanha) e água destilada. Os reagentes usados para extração e análise das antocianinas foram adquiridos da Merck (New Jersey, E.U.A) e da Tedia (Fairfield, E.U.A). Os padrões das antocianinas utilizados foram: malvidina-3-*O*-glicosídeo, petunidina-3-*O*-glicosídeo, peonidina-3-*O*-glicosídeo, delphinidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-glicosídeo, todos isolados de fontes naturais, com pureza maior do que 99% de acordo com a metodologia descrita por Gouvêa *et al.* (2012) e Santiago *et al.* (2010).

2.2 Obtenção do extrato líquido concentrado de casca de uva

A farinha da casca de uva foi submetida ao processo de extração sólido-líquido em banho termostático (Marconi, MA 093, São Paulo, Brasil) a 40 °C, utilizando solução hidroetanólica 50% (v/v) acidificada com 2% (m/v) de ácido cítrico, razão sólido:líquido de 1:10, sob agitação mecânica (200 rpm) durante uma hora (Ruíz-García *et al.*, 2019). Após a extração, os sólidos suspensos foram removidos por filtração a vácuo. O extrato líquido foi concentrado (até a metade do volume inicial) para evaporar o etanol usando um rotaevaporador a vácuo (Büchi, Flawil, Suíça) a 50 °C e agitação de 40 rpm. O extrato líquido concentrado foi armazenado a -20 °C em recipientes de cor âmbar até sua utilização.

2.3 Elaboração do preparado de frutas vermelhas

Para elaboração do preparado à base de frutas, as frutas congeladas inteiras (morango e amora, em uma proporção de 4:1) foram misturadas com açúcar refinado (40% em relação a massa total de frutas vermelhas) em liquidificador doméstico Walita, Philips. A mistura foi levada ao fogo até ebulição para dissolver o açúcar por 5 minutos, este preparado de frutas foi dividido em duas partes, em uma das partes foi adicionado 10% (m/m) do extrato concentrado de casca de uva na formulação, com a função de conferir uma coloração mais escura ao preparado de frutas vermelhas (corante natural).

Após a finalização dos preparados de fruta os mesmos foram acondicionados em sacos flexíveis laminados de polipropileno, selados e submetidos ao processo de esterilização comercial em autoclave STERIFLOW® (F₀ = 2,9), a 121 °C durante 10 minutos. Terminada a esterilização, foram separadas embalagens contendo 50 g do preparado de frutas vermelhas com extrato concentrado de casca de uva e armazenadas em câmara tipo B.O.D. a 25 ± 1 °C para avaliar a estabilidade durante 60 dias de estocagem.

2.4 Elaboração do sorvete

A formulação do sorvete base continha 70% de leite em pó reconstituído, 0,96% de emulsificante, 0,96% de estabilizante, 14,58% de creme de leite e 13,50% de açúcar (m/m). O preparado de frutas vermelhas contendo 10% (m/m) de extrato líquido concentrado de casca de uva foi adicionado para conferir cor e sabor (30% em relação à massa total do sorvete).

A mistura “calda” foi preparada misturando os ingredientes, com exceção do preparado de frutas vermelhas (com e sem o extrato de casca de uva), em um liquidificador doméstico (Walita, Philips). Após a mistura, a calda foi pasteurizada a 80 °C durante 5 minutos e resfriada, e então foi adicionado o preparado de frutas. A mistura de ingredientes foi processada em uma sorveteira (Tramontina, Breville) com capacidade para um litro em bateladas a -18 °C durante 40 min sob agitação, segundo as recomendações do fabricante. Neste equipamento ocorre simultaneamente a aeração e congelamento do produto.

O sorvete foi armazenado em recipientes de plástico (2 L) com tampa sob congelamento (-18 °C) até a realização do teste de avaliação sensorial. Para o estudo de estabilidade, uma parte do sorvete foi separada em porções de 50 g e colocada em recipientes plásticos com tampa, que foram armazenados sob congelamento a -18 °C, sendo retirados para análises de antocianinas e de cor instrumental no tempo inicial e aos 15, 30 e 60 dias de estocagem.

2.5 Composição centesimal e características físico-químicas do preparado de frutas vermelhas com extrato de casca de uva e do sorvete adicionado deste preparado

As análises de umidade, lipídeos, proteínas e cinzas foram realizadas de acordo com AOAC (2010) e os carboidratos foram calculados por diferença. A determinação do teor de sólidos solúveis (°Brix) foi realizada em refratômetro digital portátil (Atago®, modelo Pal-1 Co., Ltd., E.U.A.). Para as medidas de pH e acidez total foi utilizado um titulador automático previamente calibrado (modelo 785 DMP Titrino, Metrohm, Suíça).

A incorporação do ar no sorvete (ou *overrun*) foi calculada de acordo com a equação:

$$\textit{Overrun} = \frac{\textit{Volume final} - \textit{Volume inicial}}{\textit{Volume inicial}} \times 100 ,$$

onde o *Volume final* é o volume do sorvete e o *Volume inicial* é o volume da mistura ou calda.

2.6 Estabilidade do preparado de frutas e do sorvete durante a estocagem

2.6.1 Identificação e quantificação das antocianinas monoméricas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

Os teores das antocianinas no preparado de frutas vermelhas e no sorvete foram avaliados no tempo inicial, e após 15, 30 e 60 dias de estocagem. Para realizar a extração das antocianinas, pesou-se 1 g de amostra (preparado de frutas vermelhas ou sorvete) dentro de um tubo com tampa de rosca apropriado para utilização em centrífuga. Adicionaram-se 2 mL de solução de ácido fórmico 10% em metanol e manteve-se sob agitação em vórtex durante um minuto. A seguir, a mistura foi submetida a uma etapa de sonificação por 10 minutos e, posteriormente foi centrifugada a 6000 rpm durante 10 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para um balão volumétrico de 10 mL. O precipitado da centrifugação foi novamente submetido três vezes sucessivas ao processo de lavagem descrito acima, onde observou-se que o sobrenadante obtido perdeu sua coloração. Após a extração, completou-se para 10 mL o volume do balão volumétrico com ácido fórmico 10% em metanol. Centrifugou-se uma alíquota de 2 ou 4 mL do extrato obtido em microcentrífuga a 8000 rpm por 3 minutos. Uma alíquota de 1 ou 2 mL (volume é variável, pois depende da coloração do sobrenadante) do sobrenadante obtido foi evaporada sob ar comprimido, realizando-se em seguida a diluição com 100 ou 200 μ L (volume variável que depende da coloração do sobrenadante após secagem) de metanol 10% em ácido fórmico 5% (solução de injeção). O extrato ressuspensionado foi transferido para um *vial* e levado ao injetor do cromatógrafo líquido.

A análise cromatográfica das antocianinas foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Waters® Alliance modelo 2690/5, equipado com detector de arranjo de fotodiodos Waters® modelo 2996 (Waters, Milford, MA, USA), com varredura do espectro UV-Vis na faixa de 210 a 600 nm e quantificação em 520 nm. Uma coluna de fase reversa Thermo BDS Hypersil C₁₈ (100 × 4,6 mm; 2,4 μ m) foi utilizada para a separação das antocianinas. As antocianinas foram eluídas em gradiente com ácido fórmico 5% em metanol e acetonitrila, com fluxo de 1,0 mL/min e o tempo de corrida foi de 35 minutos. A fase A utilizada consistiu em ácido fórmico (5%) e metanol (95%), e a fase B apenas acetonitrila (100%). O gradiente utilizado de fase A foram: 0 min (95%), 2 min (93%), 10 min (90%), 15 min (87%), 16 min (85%), 20 min (83%), 30 min (80%), 33 min (95%), 35min (95%). A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C e o volume de injeção foi de 20 μ L. As antocianinas foram identificadas por comparação dos tempos de retenção e os espectros UV/Vis com os de amostras e padrões previamente caracterizados. A quantificação das antocianinas foi realizada por calibração externa. Os resultados foram expressos em mg de malvidina-3-*O*-glicosídeo equivalentes (derivados da malvidina) ou cianidina-3-*O*-glicosídeo (derivados da cianidina) por 100 g de amostra (preparado de frutas ou sorvete).

2.7 Análise da cor instrumental

A cor do preparado de frutas vermelhas adicionado de extrato líquido concentrado de casca de uva (controle e esterilizado), assim como a cor do sorvete adicionado deste preparado, foi avaliada por refletância em um colorímetro HunterLab Color Quest, modelo XE (Reston, Virginia, EUA). Foi usada uma abertura de 25 mm de diâmetro, ângulo de observação de 10° e operou-se com iluminante D65 como referência. As amostras foram colocadas em cubetas de quartzo de 10 mm e foi realizada a leitura dos parâmetros de cor usando as escalas CIELAB e CIELCh. As medidas de cor foram expressas em termos da luminosidade L^* ($L^* = 0$ é preto e $L^* = 100$ é branco) e das coordenadas a^* ($+a^*$ = vermelho e $-a^*$ = verde) e b^* ($+b^*$ = amarelo e $-b^*$ = azul). A partir de a^* e b^* , foram calculadas as coordenadas cilíndricas C_{ab}^* e h_{ab} de

acordo com as seguintes equações $C_{ab}^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ e $h_{ab} = \arctan(b^*/a^*)$. C_{ab}^* (croma) é um atributo quantitativo que define a intensidade ou saturação da cor, enquanto que h_{ab} é o ângulo de tom que define qualitativamente a tonalidade da cor. Também foi calculada a diferença total da cor ΔE^* , definida como a distância Euclidiana entre dois pontos no espaço tridimensional definidos pelos parâmetros L^* , a^* e b^* . Essa diferença é definida numericamente pela equação: $\Delta E^* = \sqrt{\Delta a^* + \Delta b^* + \Delta L^*}$ (Clydesdale e Ahmed, 1978; Sant'anna *et al.*, 2013).

2.8 Avaliação sensorial com consumidores

Para avaliação sensorial com consumidores foram elaboradas duas formulações de sorvetes: sorvete adicionado de preparado de frutas vermelhas e sorvete adicionado de preparado de frutas vermelhas contendo 10% de extrato concentrado de casca de uva. A concentração de extrato de uva adicionada ao preparado de frutas vermelhas foi selecionada em testes sensoriais preliminares (resultados não mostrados). Os sorvetes foram retirados do freezer e mantidos a 20 °C durante 5 minutos antes da avaliação sensorial. Foram servidos 10 g de cada amostra de sorvete em recipientes plásticos descartáveis com tampa e capacidade para 100 mL. Como estratégia para eliminar o efeito chamado de primeira posição foi realizado um balanceamento da apresentação das amostras. A Figura 1 ilustra a forma em que foram apresentadas as amostras de sorvete para os consumidores.



Figura 1 Apresentação das amostras de sorvete para os consumidores no teste de aceitação. Fonte: Autora

As amostras foram codificadas com números de três dígitos ao acaso (Figura 1). Um total de 116 consumidores potenciais de sorvete avaliaram a cor, textura e a aceitação global, dos sorvetes usando uma ficha com escalas hedônicas de nove pontos (onde 1 significa desgostei muitíssimo e 9 significa gostei muitíssimo) para cada atributo (Figura 2). O produto foi considerado aceito quando a pontuação média alcançou valores acima de seis (6). Na ficha, também foi incluída uma pergunta de múltipla escolha para avaliar o atributo sabor, onde o

consumidor devia relacionar o sabor do sorvete com diferentes frutas propostas (Figura 2). O estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos com o número de 53787816.8.0000.5291.

2.9 Análise estatística

Todos os resultados foram reportados como média \pm desvio padrão (DP) ($n = 3$). Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e o teste Tukey para determinar diferenças significativas entre os tempos avaliados quanto aos teores das antocianinas monoméricas e aos parâmetros de cor. O teste t de Student foi usado para determinar as diferenças significativas entre os sorvetes para cada atributo avaliado no teste de aceitação. Para todas as análises estatísticas, utilizou-se o programa *Statistica* 10.0 (StatSoft, Tulsa, EUA) com o nível de significância de 5%.

Você está recebendo uma amostra de sorvete. Observe, cheire, prove-a e marque na escala abaixo o quanto você gostou deste sorvete:

Aceitação Global

Desgostei extremamente Nem gostei nem desgostei Gostei extremamente **501**

Cor

Desgostei extremamente Nem gostei nem desgostei Gostei extremamente

Textura

Desgostei extremamente Nem gostei nem desgostei Gostei extremamente

Agora, assinale quais destas FRUTAS você considera adequado para descrever O SABOR deste sorvete:

morango uva
 ameixa frutas vermelhas
 jabuticaba outra
 amora não sei
 framboesa

Próxima página

Figura 2 Ficha de avaliação utilizada no teste de aceitação dos sorvetes

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização do preparado de frutas vermelhas adicionado de extrato de casca de uva e do sorvete adicionado deste preparado

A Tabela 1 apresenta a composição centesimal e as características físico-químicas do preparado de frutas vermelhas adicionado de extrato de casca de uva e do sorvete adicionado deste preparado. De acordo com a legislação brasileira, o sorvete deve conter um mínimo de 2,5% de proteínas e 3,0% de lipídeos, respectivamente (ANVISA, 1999). O sorvete

desenvolvido neste estudo cumpre com os requerimentos legais quanto ao teor de lipídeos (3,43%) mas não quanto ao teor de proteínas (1,56%). Dos Santos Cruxen *et al.* (2017) também reportaram um baixo teor de proteínas no sorvete de butiá. Os autores atribuíram esse resultado ao elevado teor de polpa da fruta (40%) adicionada na formulação. O baixo teor de proteínas observado neste estudo também poderia estar relacionado com a adição de 30% do preparado de frutas, que geralmente possuem baixo teor proteico. O teor de umidade encontrado no produto (73,92%) foi maior que os teores geralmente reportados em sorvete de 55% a 65% (Arbuckle, 2013), o que poderia estar relacionado à adição do preparado de frutas com extrato líquido de casca de uva na formulação do sorvete. Teores de cinzas e carboidratos no sorvete, similares aos obtidos, neste estudo foram reportados por Vital *et al.* (2018) em sorvete enriquecido com bagaço de uva e Karaman *et al.* (2014) em sorvete à base de purê de caqui.

O valor de pH do sorvete foi baixo devido à adição do preparado de frutas pois, a maioria das frutas, possuem pH baixo e acidez total elevada (Tabela 1), devido à presença de ácidos orgânicos. Vital *et al.* (2018) reportaram que houve uma diminuição do pH no sorvete ao aumentar a concentração de bagaço de uva na formulação, pela presença dos ácidos tartárico e málico, majoritários nas uvas.

Neste estudo, a acidez elevada do preparado de frutas e conseqüentemente do sorvete, provavelmente, se deve à adição do extrato de casca de uva que contém ácido cítrico. Dessa forma, a mistura do leite com pH 6,4–6,8 com o pH do preparado de frutas (2,89) resultou em um pH baixo no sorvete. Soares *et al.* (2018) reportaram que incrementando a concentração de leite e açúcar e diminuindo a concentração de polpa de fruta na mistura, é possível diminuir a acidez do meio e, conseqüentemente, incrementar o pH.

Tabela 1 Composição centesimal e características físico-químicas do preparado de frutas vermelhas (morango e amora) adicionado de extrato de casca de uva e do sorvete adicionado deste preparado

Análises	Amostras	
	PFE	SPFE
Umidade (g.100 g ⁻¹)	69,61 ± 0,38	73,92 ± 0,33
Cinzas (g.100 g ⁻¹)	0,29 ± 0,01	0,60 ± 0,01
Proteínas (g.100 g ⁻¹)	0,25 ± 0,00	1,56 ± 0,00
Lipídeos (g.100 g ⁻¹)	0,52 ± 0,07	3,43 ± 0,09
Carboidratos (g.100 g ⁻¹)	29,54 ± 0,33	21,81 ± 0,43
pH	2,89 ± 0,01	4,16 ± 0,01
Acidez total (g (ácido tartárico).100 mL ⁻¹)	25,99 ± 0,06	7,41 ± 0,04
Sólidos solúveis totais (° Brix)	29,50 ± 0,10	52,97 ± 0,12

Valores expressos como média ± DP (n = 3). PFE: Preparado de frutas vermelhas com extrato de casca de uva. SPFE: Sorvete com preparado de frutas vermelhas e extrato de casca de uva.

A incorporação de ar (*overrun*) é uma característica importante do sorvete, pois o ar incorporado garante que a textura do sorvete seja leve e agradável e também influencia nas características físicas como a dureza e a fusão (Dos Santos Cruxen *et al.*, 2017). O *overrun* do sorvete adicionado de preparado de frutas vermelhas com extrato de casca de uva foi de 13,71

$\pm 1,09\%$, sendo menor em comparação com o valor obtido para o sorvete base ($23,58 \pm 2,10\%$). Soares *et al.* (2018) avaliaram diferentes formulações de *sherbets* adicionados com polpa de jambo e concluíram que a incorporação do ar estava relacionada com o teor de gorduras do leite usado na formulação. Neste estudo o teor de lipídeos foi baixo e pode ser uma das causas do baixo *overrun*. O ar incorporado no produto é disperso na emulsão, tornando o produto mais macio e aumentando a sua qualidade sensorial (Marshall *et al.*, 2012). Vital *et al.* (2018) observaram que a diminuição do pH provocada pela adição de bagaço de uva diminuiu significativamente o *overrun* do sorvete.

3.2 Efeito do processo de esterilização e do tempo de estocagem sobre o teor de antocianinas monoméricas

Como mostrado na Tabela 2, foram identificadas nove antocianinas no preparado de frutas vermelhas com extrato de casca de uva. As antocianinas detectadas foram as antocianinas majoritárias das frutas utilizadas para elaborar o preparado de frutas: morango, amora e uva. A cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3-rutinosídeo e cianidina-3-dioxalil-glicosídeo foram reportadas anteriormente como as antocianinas majoritárias da amora (Wang e Xu, 2007).

Na composição do morango predominam as antocianinas derivadas da pelargonidina: pelargonidina-3-glicosídeo e pelargonidina-3-rutinosídeo e, em menor proporção, as derivadas da cianidina, como cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo (Wang *et al.*, 2015a). Finalmente, foram detectadas as antocianinas que se encontraram em maior concentração no extrato de casca de uva cv. Alicante Bouschet, peonidina-3-glicosídeo, malvidina-3-glicosídeo, peonidina-3-(6-*p*-cumaroil)-glicosídeo e malvidina-3-(6-*p*-cumaroil)-glicosídeo. O extrato de casca de uva também poderia ter contribuído para aumentar o teor total de cianidina-3-glicosídeo, principalmente no preparado de frutas controle, enquanto que a delphinidina-3-glicosídeo e petunidina-3-glicosídeo, presentes na composição do extrato de casca de uva, não foram detectadas no preparado de frutas.

Na Tabela 2 são apresentados os teores das antocianinas majoritárias no preparado de frutas vermelhas (morango e amora) com extrato de casca de uva antes e após o processo de esterilização. O processo de esterilização provocou perdas de aproximadamente 91% do teor de antocianinas monoméricas totais e perdas acima de 76% nos teores de antocianinas individuais avaliadas. Estes resultados indicam que o tratamento térmico a 121 °C durante 10 minutos não foi apropriado para esterilizar o preparado de frutas vermelhas com extrato de uva devido às perdas de antocianinas e, conseqüentemente, a degradação da cor, que afetou a qualidade do produto.

Apesar de o processo de esterilização ser necessário para inativação de enzimas e eliminação de microrganismos que possam deteriorar o produto durante a estocagem, constitui uma etapa crítica no processamento de produtos à base de frutas vermelhas. Diante dos resultados, seriam necessários estudos futuros para otimizar a relação temperatura/tempo no processo de esterilização, além de testar outros métodos de conservação do preparado de frutas a fim de preservar as suas propriedades nutricionais e sensoriais. You *et al.* (2018) estudaram a influência de diferentes tratamentos sobre a cor e o teor de antocianinas no processamento de suco de amora. Os autores verificaram que a pasteurização a 70 °C durante 10 minutos, a esterilização a 110 °C durante 8,6 segundos e também a aplicação de altas pressões (400 MPa/5 minutos) foram métodos eficientes para manter a estabilidade das antocianinas e a cor do suco de amora durante a estocagem.

Tabela 2 Teores das antocianinas majoritárias no preparado de frutas vermelhas (morango e amora) com extrato de casca de uva antes e após o processo de esterilização

Antocianinas (mg.100 g ⁻¹)	PFE controle	PFE esterilizado (tempo 0)	Perdas (%)
Cy3gl	5,071 ± 0,153	0,284 ± 0,001	94
Cy3rut	0,289 ± 0,002	0,054 ± 0,004	81
Pg3gl	2,945 ± 0,040	0,399 ± 0,009	86
Pg3rut	0,150 ± 0,004	0,037 ± 0,001	76
Pn3gl	0,329 ± 0,006	0,067 ± 0,001	80
Mv3gl	1,169 ± 0,011	0,063 ± 0,001	95
Cy-3-dioxalilgl	0,207 ± 0,009	0,033 ± 0,000	84
Pn-3-6cmgl	0,424 ± 0,025	0,062 ± 0,001	85
Mv-3-6cmgl	1,717 ± 0,035	0,142 ± 0,002	92
Total	12,297	1,138	91

PFE controle: preparado de frutas vermelhas com extrato de casca de uva antes de ser submetido à esterilização. PFE esterilizado: Preparado de frutas vermelhas com extrato de casca de uva após esterilização. Cy3gl: cianidina-3-glicosídeo, Cy3rut: cianidina-3-rutinosídeo, Pg3gl: pelargonidina-3-glicosídeo, Pg3rut: pelargonidina-3-rutinosídeo, Pn3gl: peonidina-3-glicosídeo, Mv3gl: malvidina-3-glicosídeo, Cy-3-dioxalilgl: cianidina-3-dioxalil-glicosídeo, Pn-3-6cmgl: peonidina-3-(6-*p*-cumaroil)-glicosídeo, Mv-3-6cmgl: malvidina-3-(6-*p*-cumaroil)-glicosídeo.

A Figura 3 ilustra os teores das antocianinas majoritárias no preparado de frutas vermelhas (morango e amora) adicionado de extrato de casca de uva durante a estocagem a 25 °C. Transcorridos 15 dias da estocagem a 25 °C, houve uma perda de mais de 56% de antocianinas totais no preparado de frutas em comparação ao tempo inicial (após esterilização). Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) nos teores de cianidina-3-glicosídeo, malvidina-3-glicosídeo, peonidina-3-(6-*p*-cumaroil)-glicosídeo e malvidina-3-(6-*p*-cumaroil)-glicosídeo no tempo inicial e em 15 dias de estocagem. Após 30 dias de estocagem do preparado de frutas, só foram detectadas duas antocianinas no produto: cianidina-3-glicosídeo e pelargonidina-3-glicosídeo, as restantes não foram quantificadas pois a concentração estava abaixo do limite de quantificação do método. Finalmente, aos 60 dias da estocagem não houve detecção de antocianinas.

Diversos estudos têm reportado que as antocianinas de diferentes matrizes são instáveis a temperaturas elevadas como as aplicadas no processamento e na estocagem de: geleia de morango (Patras *et al.*, 2011), suco de morango (Wang *et al.*, 2015b), sucos de uva e morango (Hernández-Herrero e Frutos, 2014) e suco de amora (Wang e Xu, 2007; You *et al.*, 2018). As perdas das antocianinas monoméricas podem acontecer devido ao processo de oxidação que leva à formação de compostos poliméricos. Também podem ocorrer reações de condensação entre as antocianinas com outros compostos fenólicos como os flavanóis e reações de copigmentação entre as antocianinas e ácidos fenólicos que resultam em novos pigmentos responsáveis pela cor após o tratamento térmico e durante a estocagem (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009).

A maioria dos estudos apontam que a estabilidade térmica depende da composição da matriz e da concentração e estrutura química dos pigmentos (Giusti e Wrolstad, 2003; Fournier-Level *et al.*, 2011; Han e Xu, 2015; Tang *et al.*, 2017). Foi observado que somente a cianidina-

3-glicosídeo e a pelargonidina-3-glicosídeo permaneceram no preparado de frutas até 30 dias de estocagem, provavelmente devido ao fato de que essas antocianinas se encontraram em maior concentração, pois são as antocianinas majoritárias da amora e do morango. Apesar das antocianinas com grupos metoxila e grupos acila ligados a molécula (como a peonidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo e suas derivadas aciladas presentes no extrato de casca de uva) terem sido reportadas como as mais estáveis (Fournier-Level *et al.*, 2011), devido a sua menor concentração no preparado de frutas, não foram observadas após os 30 dias de estocagem. Isto poderia indicar que o efeito da concentração do pigmento teve maior influência na estabilidade das antocianinas do preparado de frutas. Estes resultados também podem estar relacionados a que a cinética de degradação de cada antocianina individualmente é diferente.

A degradação térmica das antocianinas como a cianidina-3-glicosídeo e a pelargonidina-3-glicosídeo começa com a reação de deglicosilação (perda do grupo glicosídeo ligado à molécula de antocianina). Em seguida se produz a clivagem do anel B que resulta em ácido protocatecuico a partir da pelargonidina-3-glicosídeo e em ácido 4-hidroxibenzoico a partir da cianidina-3-glicosídeo. Finalmente, a degradação do anel A produz floroglucinaldeído como produto final (Patras *et al.*, 2010).

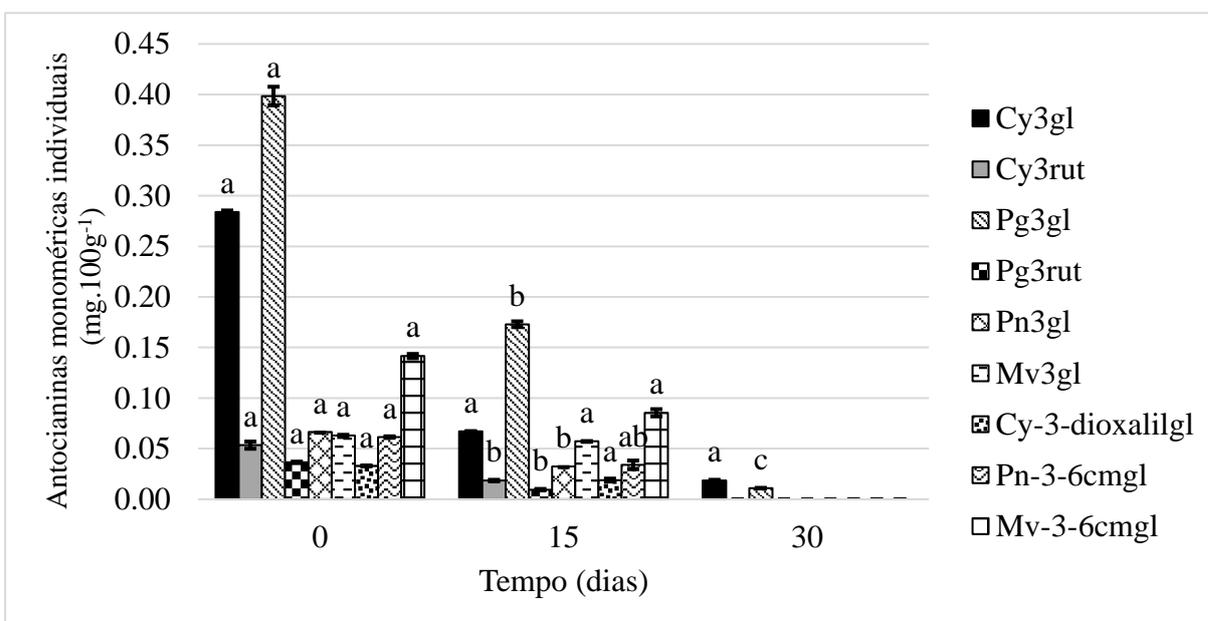


Figura 3 Teores das antocianinas majoritárias no preparado de frutas vermelhas (morango e amora) com extrato de casca de uva durante a estocagem a 25 °C. Cy3gl: cianidina-3-glicosídeo, Cy3rut: cianidina-3-rutinosídeo, Pg3gl: pelargonidina-3-glicosídeo, Pg3rut: pelargonidina-3-rutinosídeo, Pn3gl: peonidina-3-glicosídeo, Mv3gl: malvidina-3-glicosídeo, Cy-3-dioxalilgl: cianidina-3-dioxalil-glicosídeo, Pn-3-6cmgl: peonidina-3-(6-*p*-cumaroil)-glicosídeo, Mv-3-6cmgl: malvidina-3-(6-*p*-cumaroil)-glicosídeo. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) nos teores de antocianinas entre os tempos de estocagem

No sorvete, foram detectadas as mesmas antocianinas que no preparado de frutas, o que indica que o processo de elaboração do sorvete não afetou a composição de antocianinas do preparado de frutas. Aos 15 dias de estocagem do sorvete, a maioria das antocianinas diminuiu a sua concentração, sendo detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) em comparação com o tempo inicial ($t = 0$) (Figura 4). A peonidina-3-(6-*p*-cumaroil)-glicosídeo foi a exceção, cuja concentração aos 15 dias não diferiu significativamente ($p > 0,05$) do tempo inicial e também do teor observado aos 30 dias da estocagem. A peonidina-3-glicosídeo também se manteve

estável após 30 dias de estocagem não sendo observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) quando comparado seu teor com o tempo anterior ($t = 15$). A maior estabilidade dessas antocianinas no sorvete pode ser relacionada com o fato de serem as majoritárias e as mais estáveis do extrato de casca de uva cv. Alicante Bouschet (Castillo-Muñoz *et al.*, 2009; Ky *et al.*, 2014; Favre *et al.*, 2019). O grupo metoxi, presente tanto na peonidina-3-glicosídeo como em sua derivada acilada (peonidina-3-(6-*p*-cumaroil)-glicosídeo), estabiliza a molécula e reduz a sua reatividade em meio aquoso em comparação com as antocianinas hidroxiladas (Fournier-Level *et al.*, 2011). Por outro lado, na acilação com ácido *p*-cumárico presente na peonidina-3-(6-*p*-cumaroil)-glicosídeo, o anel pirrólico é protegido do ataque nucleofílico da água o que melhora a estabilidade da molécula (Giusti e Wrolstad, 2003). Finalmente, aos 60 dias da estocagem aumentaram significativamente ($p < 0,05$) os teores das antocianinas no sorvete, inclusive foram maiores do que aqueles observados no tempo inicial. Uma possível explicação para esse resultado poderia ser que tenham ocorrido oscilações na temperatura do freezer durante a estocagem, o que favorece o processo de cristalização, concentrando as antocianinas, na fase não congelada do sorvete (Marshall *et al.*, 2012; Goff e Hartel, 2013).

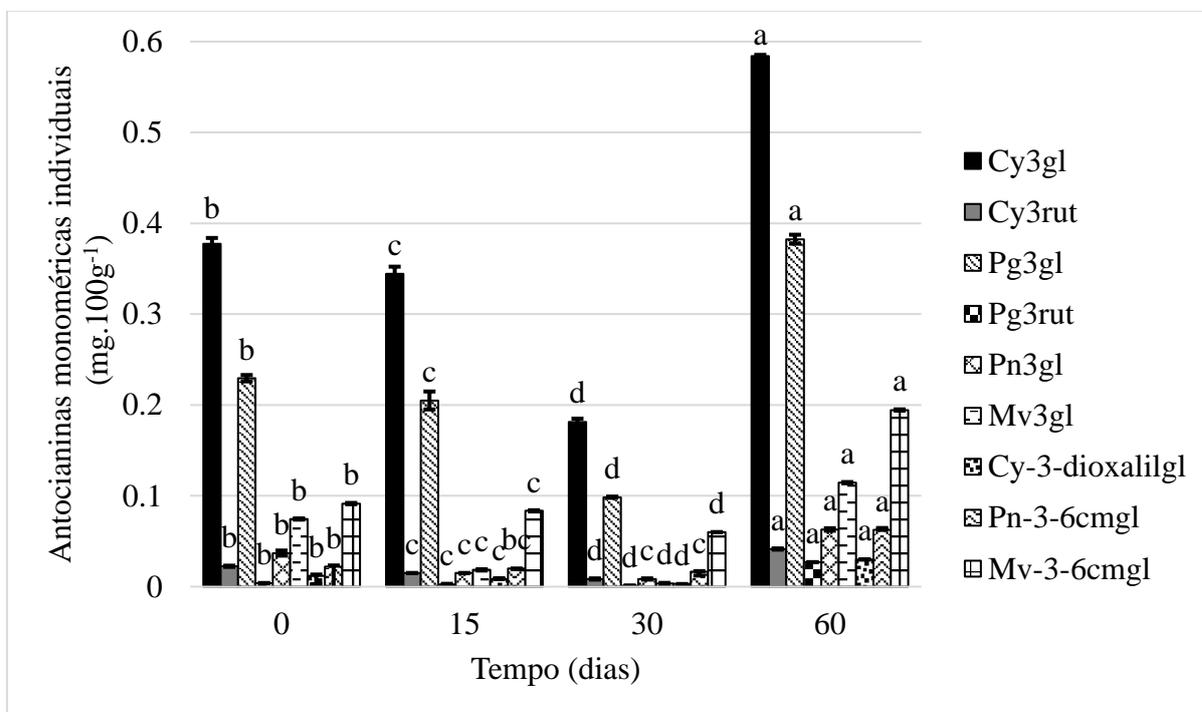


Figura 4 Teores das antocianinas majoritárias no sorvete adicionado do preparado de frutas vermelhas (morango e amora) com extrato de casca de uva durante a estocagem. Cy3gl: cianidina-3-glicosídeo, Cy3rut: cianidina-3-rutinosídeo, Pg3gl: pelargonidina-3-glicosídeo, Pg3rut: pelargonidina-3-rutinosídeo, Pn3gl: peonidina-3-glicosídeo, Mv3gl: malvidina-3-glicosídeo, Cy-3-dioxalilgl: cianidina-3-dioxalil-glicosídeo, Pn-3-6cmgl: peonidina-3-(6-*p*-cumaroil)-glicosídeo, Mv-3-6cmgl: malvidina-3-(6-*p*-cumaroil)-glicosídeo. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) nos teores das antocianinas entre os tempos de estocagem

3.3 Efeito do processo de esterilização e da estocagem sobre os parâmetros de cor

Os parâmetros de cor do preparado de frutas vermelhas com extrato e do sorvete nos diferentes tempos da estocagem são listados na Tabela 3. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) em todos os parâmetros de cor, com exceção do parâmetro L^* ao comparar o preparado de frutas controle e o preparado de frutas esterilizado.

De forma geral, os valores observados na diferença total da cor (ΔE^*) indicam que as diferenças de cor foram pequenas ($\Delta E^* < 2$) (Limbo e Piergiovanni, 2006; You *et al.*, 2018) entre o preparado de frutas controle e o preparado de frutas após a esterilização, assim como também entre os diferentes tempos de estocagem. Apesar da degradação das antocianinas monoméricas com o tratamento térmico e, posteriormente, ao longo da estocagem, outros pigmentos de cor similar podem ter se formado no preparado e como consequência, uma pequena diferença na cor foi detectada. A Figura 5 ilustra a cor do preparado de frutas com extrato de casca de uva antes e após o processo de esterilização. Após o tratamento térmico severo de alimentos que contêm aminoácidos e açúcares redutores são produzidos o 5-(hidroximetil)furfural e o furfural como resultado da reação de Maillard. Esses compostos de cor marrom são indicadores da deterioração da qualidade e do impacto do calor excessivo durante o processamento e na estocagem dos alimentos (Perez-Locas e Yaylayan, 2010).

Tabela 3 Parâmetros de cor do preparado de frutas vermelhas com extrato de casca de uva e do sorvete adicionado deste preparado antes da esterilização e durante 60 dias de estocagem

Tempo (dias)	Parâmetros de cor						
	L^*	a^*	b^*	C_{ab}^*	h_{ab}	ΔE^*	
Controle	27,73 ± 0,08 c	5,21 ± 0,08 a	0,45 ± 0,04 b	5,23 ± 0,08 a	4,90 ± 0,38 b	0	
0	PFE	27,84 ± 0,07 c	4,29 ± 0,02 b	0,08 ± 0,005 c	4,29 ± 0,05 b	0,99 ± 0,03 c	1,18 ± 0,03 a
15		28,04 ± 0,14 b	4,19 ± 0,05 bc	0,34 ± 0,02 b	4,20 ± 0,05 b	4,57 ± 0,38 b	0,75 ± 0,08 b
30		28,36 ± 0,03 a	4,10 ± 0,11 c	0,87 ± 0,08 a	4,20 ± 0,12 b	11,91 ± 0,86 a	1,23 ± 0,01 a
60		28,24 ± 0,04 a	4,09 ± 0,11 c	0,80 ± 0,07 a	4,16 ± 0,12 b	11,02 ± 0,84 a	1,15 ± 0,03 a
0		SPFE	64,58 ± 0,07 A	10,69 ± 0,03 AB	0,68 ± 0,02 B	10,71 ± 0,03 AB	3,63 ± 0,09 B
15	60,26 ± 0,09 B		10,62 ± 0,07 A	0,49 ± 0,03 C	10,63 ± 0,07 A	2,64 ± 0,13 C	4,33 ± 0,08 C
30	57,11 ± 0,08 D		10,46 ± 0,04 B	0,48 ± 0,03 C	10,47 ± 0,04 B	2,62 ± 0,15 C	7,48 ± 0,08 A
60	59,14 ± 0,07 C		10,51 ± 0,06 B	1,05 ± 0,03 A	10,56 ± 0,07 AB	5,67 ± 0,13 A	5,46 ± 0,07 B

Valores expressos como média ± DP (n = 4). Controle: preparado de frutas antes de ser submetido a esterilização. PFE: Preparado de frutas vermelhas com extrato de casca de uva, SPFE: Sorvete adicionado de preparado de frutas vermelhas e extrato de casca de uva. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes tempos durante a estocagem do PFE de acordo com o teste Tukey. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos de estocagem do SPFE de acordo com o teste Tukey

Em estudos realizados por Es-Safi *et al.* (2000) e Es-Safi *et al.* (2002) foi reportado que o 5-hidroximetilfurfural e furfural participam em reações de condensação com as antocianinas e os flavanóis como a (+)-catequina, compostos fenólicos presentes na composição natural de morangos (Wang *et al.*, 2019), amoras (Schulz *et al.*, 2019) e uvas (Zerbib *et al.*, 2018). Os

autores observaram a diminuição nos teores de antocianinas e flavanóis, enquanto que foram detectados adutos: flavanol-furfural e antocianina-furfural-flavanol. Os novos compostos apresentaram espectros UV-Vis similares a cianidina-3-glicosídeo, a antocianina precursora, mas com máximos de absorção deslocados a maiores comprimentos de onda (535–540 nm), o que indicou a presença de pigmentos vermelhos derivados de antocianinas. Também foram detectados derivados incolores correspondentes a dímeros formados a partir da catequina e compostos amarelados apresentando máximos de absorção em torno de 460 nm, que correspondem à formação de sais de xanteno e xantílio.



Figura 5 Preparado de frutas vermelhas com extrato de casca de uva antes (a) e após (b) o processo de esterilização. Fonte: Sidney Pacheco

Neste estudo, os valores positivos das coordenadas a^* e b^* indicaram que a cor do preparado de frutas vermelhas encontra-se no I quadrante e próxima da origem da esfera de cor CIELab antes da esterilização e durante a estocagem. Porém, foi observado uma diminuição significativa de a^* , b^* , C_{ab}^* e h_{ab} após o tratamento térmico, mas a cor se manteve com tonalidade vermelha escura e mais opaca, provavelmente devido à formação dos pigmentos vermelhos derivados das antocianinas anteriormente descritos. Ao comparar o preparado de frutas no tempo inicial ($t = 0$) e após 15 dias da estocagem houve um aumento significativo ($p < 0,05$) da luminosidade (L^*) e do parâmetro h_{ab} , que continuaram aumentando até os 30 dias e se mantiveram sem variação até 60 dias da estocagem. Essa variação dos parâmetros de cor resultou na mudança da cor de tons vermelhos escuros para tons vermelho-alaranjados e/ou vermelho-marrons, que poderia se relacionar com a presença de compostos vermelhos e amarelos. Esses resultados são similares aos obtidos por Es-Safi *et al.* (2002), ao avaliar a cor de uma solução modelo contendo (+)-catequina, cianidina-3-*O*-glicosídeo e furfural durante a estocagem. Foi observado um aumento da cor na região do marrom (420-450 nm), enquanto houve uma perda gradual de cor na região do vermelho (520 nm), indicando que ocorreram reações de escurecimento e perda das antocianinas.

Quanto ao sorvete, os elevados valores do parâmetro L^* observados correspondem a uma cor clara relacionada com o leite, ingrediente predominante no preparo do sorvete. Os valores positivos de a^* e b^* e também o valor de h_{ab} próximo de zero permitem situar a cor do sorvete no I quadrante da esfera de cor CIELab, na região do vermelho. Contudo, devido à elevada luminosidade, a cor do sorvete poderia ser descrita como rosa clara. Após 15 dias da estocagem do sorvete a $-18\text{ }^\circ\text{C}$ foi observada uma diferença de cor perceptível ($3 < \Delta E^* < 6$) (Limbo e Piergiovanni, 2006; You *et al.*, 2018), que deve ter sido influenciada principalmente

pela diminuição significativa ($p < 0,05$) dos parâmetros L^* e b^* em comparação com o tempo zero. Estes resultados, conjuntamente com a pouca variação no parâmetro a^* , poderiam estar relacionados com a presença dos pigmentos avermelhados derivados das antocianinas no preparado de frutas adicionado como corante no sorvete. Pode ser que esses novos pigmentos mantenham a coloração rosa clara inicial do sorvete apesar da diminuição do teor de antocianinas do produto. A Figura 6 ilustra a cor do sorvete adicionado de preparado de frutas vermelhas sem extrato de casca de uva e com extrato de casca de uva.



Figura 6 Sorvete adicionado de preparado de frutas vermelhas sem extrato de casca de uva (a) e com (b) extrato de casca de uva. Fonte: Autora

Por outro lado, até os 30 dias da estocagem observou-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) do parâmetro L^* , e também foi observada uma diminuição nos parâmetros b^* e h_{ab} o que indica a manutenção da mesma tonalidade, porém, mais escura. Estas mudanças resultaram numa maior diferença de cor, que, de acordo com Limbo e Piergiovanni (2006), significou uma forte diferença ($6 < \Delta E^* < 12$) em comparação com a cor inicial. Essas diferenças poderiam estar relacionadas à progressão da formação de pigmentos durante a estocagem. Ao final da estocagem a diminuição significativa ($p < 0,05$) do parâmetro L^* e o aumento significativo ($p < 0,05$) de b^* e de h_{ab} poderiam estar relacionados com o aumento observado no teor de antocianinas monoméricas no sorvete.

3.4 Correlação entre o teor de antocianinas e os parâmetros de cor

O teor de antocianinas totais e de antocianinas individuais presentes no preparado de frutas vermelhas com extrato de casca de uva e do sorvete adicionado desse preparado, assim como os parâmetros de cor medidos tanto no controle quanto na estocagem, foram analisados mediante correlação linear de Pearson, com o objetivo de investigar a relação entre o teor de antocianinas e a cor dos produtos. Os resultados para o preparado de frutas vermelhas com extrato de casca de uva indicaram que o parâmetro luminosidade L^* mostrou uma moderada correlação significativa e negativa ($r = -0,68$) ($p < 0,05$) com o teor de antocianinas totais, enquanto que os parâmetros a^* e C_{ab}^* exibiram uma correlação positiva e significativa muito forte ($r = 0,98$) ($p < 0,05$) (Mukaka, 2012) com o teor de antocianinas totais. Este resultado indica que com maior teor de antocianinas, a cor é mais escura (menores valores de L^*), mais

opaca e predomina a cor vermelha. Figueiredo-González *et al.* (2013) também observaram que os vinhos com menores valores de L^* e menores valores de a^* apresentaram elevados teores de antocianinas, indicando a cor vermelha escura dos vinhos avaliados. You *et al.* (2018) reportaram resultados similares ao avaliar a influência de diferentes tratamentos de esterilização sobre a cor e o teor de antocianinas do suco de amora durante a estocagem sob refrigeração. Os autores observaram que com maior teor de antocianinas, mais roxa foi a cor do suco de amora, menos brilhante e mais saturada. A diferença total da cor ΔE^* mostrou uma correlação negativa e significativa ($r = -0,92$) ($p < 0,05$) com o teor de antocianinas totais do preparado de frutas vermelhas com extrato de casca de uva, o que significa que quanto maior a diferença de cor entre dois tempos durante a estocagem, foi maior a degradação das antocianinas.

O teor de antocianinas totais do sorvete mostrou uma correlação positiva muito forte e significativa com os parâmetros b^* e h_{ab} ($r = 0,95$) ($p < 0,05$), que significa que em maiores valores de b^* e h_{ab} predominam as cores azul, roxa e vermelha relacionadas com uma maior concentração de antocianinas. A correlação entre o teor de antocianinas individuais e os parâmetros de cor mostrou um comportamento similar, como esperado, tanto para o preparado de frutas quanto para o sorvete.

3.5 Avaliação sensorial

A escala hedônica de nove pontos tem sido amplamente utilizada em estudos de preferência para avaliar uma gama enorme de produtos com consumidores adultos (Dutcosky, 2011). Os resultados do teste de aceitação dos sorvetes são mostrados na Tabela 4. Um total de 116 consumidores participaram da avaliação sensorial e ambos os sorvetes tiveram boa aceitação, com uma média hedônica acima de 6. Porém, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as pontuações, sendo melhor aceito o sorvete com preparado de frutas vermelhas, sem o extrato de casca de uva. Este resultado pode ser devido ao fato de que o extrato de casca de uva confere um sabor adstringente (devido à presença de taninos) e mais ácido (devido à presença de ácido cítrico) ao sorvete. Em relação ao atributo textura, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$), o que indica que a adição de extrato não afetou a textura do sorvete.

Tabela 4 Características sensoriais dos sorvetes adicionados do preparado de frutas vermelhas com e sem extrato de casca de uva

Amostras de sorvete	Atributos ^a		
	Aceitação global	Cor	Textura
SPF	6,81 a	5,72 b	6,72 a
SPFE	6,09 b	7,68 a	6,43 a

Valores expressos como média \pm DP (n = 116). ^a Avaliados de acordo com a escala hedônica (1 = desgostei muitíssimo a 9 = gostei muitíssimo). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) de acordo com o teste *t* de Student para amostras pareadas. SPF: Sorvete adicionado de preparado de frutas vermelhas, SPFE: Sorvete adicionado de preparado de frutas vermelhas e extrato de casca de uva

Quanto à avaliação do atributo cor, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras, sendo que o sorvete com preparado de frutas vermelhas adicionado de extrato

de casca de uva foi melhor aceito obtendo uma nota de 7,68 em comparação com o sorvete sem adição de extrato de casca de uva (5,72). Este resultado foi considerado muito bom, pois, o principal objetivo da adição do extrato de casca de uva no preparado de frutas vermelhas na formulação do sorvete foi conferir cor. A cor natural aportada pelas frutas usadas na elaboração do preparado (morango e amora) não foi suficiente para colorir o sorvete, o que ficou demonstrado pela baixa avaliação da cor do sorvete de frutas vermelhas sem adição de extrato de casca de uva.

Na pergunta de múltipla escolha, os consumidores podiam selecionar mais de uma fruta para descrever o sabor dos sorvetes. A Figura 7 representa a porcentagem de vezes que foi selecionada cada fruta para descrever o sabor dos sorvetes. O morango foi a fruta mais escolhida (em 22% das respostas) para descrever o sabor do sorvete elaborado com preparado de frutas vermelhas sem o extrato de casca de uva enquanto que a maior porcentagem de respostas (20%) relacionou a uva com o sorvete adicionado de extrato de casca de uva.

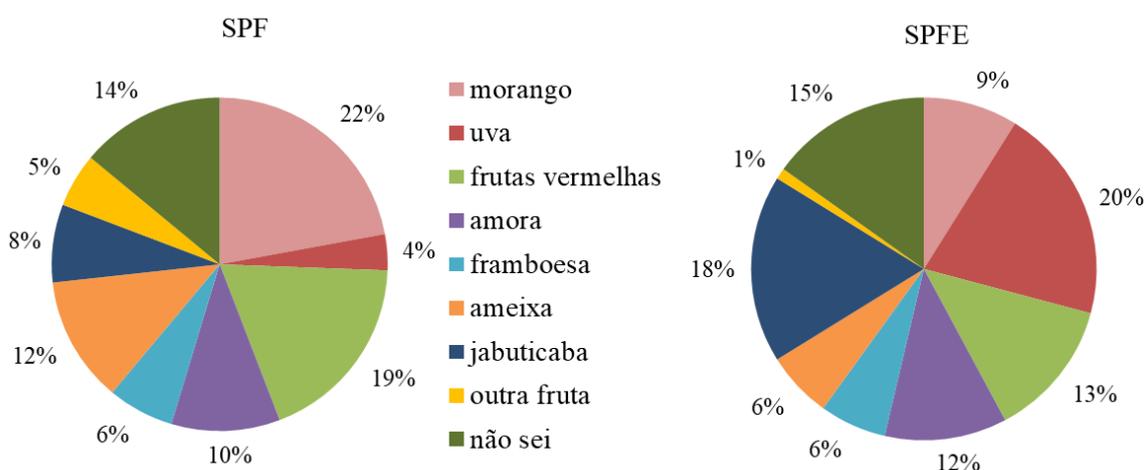


Figura 7 Porcentagem (% em relação ao total de respostas) de escolha de cada fruta para descrever o sabor dos sorvetes. SPF (sorvete adicionado de preparado de frutas vermelhas). SPFE (sorvete adicionado de preparado de frutas com extrato de casca de uva)

Esses resultados se correspondem satisfatoriamente com a formulação do preparado de frutas vermelhas adicionado ao sorvete, que foi elaborado a partir de polpa de morango e amora (4:1), o que fez com que predominasse o sabor de morango no sorvete. Como esperado, as frutas vermelhas foram as mais selecionadas (19%) depois do morango para descrever o sabor do sorvete elaborado somente com o preparado de frutas. Por outro lado, o sabor uva predominou quando o extrato de casca de uva foi adicionado à formulação. Em seguida, a jabuticaba foi a fruta mais escolhida para descrever o sabor do sorvete elaborado com o preparado de frutas e extrato de casca de uva. De acordo com os resultados, o extrato concentrado de casca de uva melhorou a cor percebida pelos consumidores na análise sensorial e não afetou negativamente a textura do sorvete, pois não foi observada diferença significativa entre as duas amostras. Portanto, o extrato concentrado de casca de uva teria potencial de utilização como substituto dos corantes sintéticos geralmente utilizados em alimentos.

Os corantes sintéticos chamados de corantes azo, como por exemplo: Vermelho 40 (E129), Ponceau 4R (E124), Amaranto (E123), Azorrubina (E122) e outros corantes não azo como a Eritrosina (E127), geralmente usados para conferir tons de vermelho aos alimentos, têm

sido associados a efeitos tóxicos como alergias e hiperatividade, principalmente em crianças (Aberoumand, 2011; Chapman, 2011; Feketea e Tsabouri, 2017). Dessa forma, os consumidores estão cada vez mais preocupados e rejeitam os alimentos que contêm corantes artificiais e, conseqüentemente, a indústria de alimentos procura alternativas de corantes obtidos de fontes naturais. É conhecido que extratos obtidos a partir da casca de uva (Antocianinas, E163) são usados como corantes em alimentos, e não têm sido descritos casos de alergias associados a esse tipo de corantes (Feketea e Tsabouri, 2017). Portanto, o extrato líquido concentrado obtido a partir da casca do bagaço de uva cv. Alicante Bouschet poderia ser usado como corante natural em preparados de frutas vermelhas para adição em sorvetes, entre outros produtos. Contudo, seria necessário fazer ajustes na formulação do sorvete adicionado de extrato de casca de uva para reavaliar, principalmente o atributo sabor, no intuito de melhorar a sua aceitação global.

CONCLUSÕES GERAIS

O teor de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante do extrato obtido a partir de cascas da uva cv. Alicante Bouschet foram dependentes do processo de extração, principalmente da temperatura e da concentração de etanol. As condições mais adequadas para a extração de compostos bioativos com capacidade antioxidante foram: temperatura de extração de 40 °C, concentração de etanol de 50% v/v e concentração de ácido cítrico de 2% m/v.

O extrato líquido concentrado é fonte de compostos fenólicos, principalmente antocianinas monoméricas e possui elevada capacidade antioxidante. As antocianinas majoritárias no extrato foram a malvidina-3-*O*-(6-*O*-*p*-cumaroil)-glicosídeo e a malvidina-3-*O*-glicosídeo.

A cor roxa avermelhada escura e opaca do extrato permaneceu estável sob congelamento a -18 °C até 45 dias de estocagem, porém pouco estável sob refrigeração a 5 °C (15 dias).

O extrato líquido concentrado de casca de uva apresentou potencial antimicrobiano principalmente contra *Staphylococcus aureus*.

A bioacessibilidade de antocianinas monoméricas e flavanóis foi baixa (23% e 25%, respectivamente), após a digestão *in vitro*. Contudo, a bioacessibilidade dos ácidos fenólicos foi elevada (> 100%) após a digestão e a fermentação colônica *in vitro*, resultando em uma elevada atividade antioxidante nestas fases.

Apesar de que 24 horas de fermentação colônica *in vitro* não foram suficientes para estimular a multiplicação dos microrganismos da microbiota intestinal, a produção de ácidos graxos de cadeia curta sugere que o extrato de casca de uva favoreceu a atividade metabólica da microbiota e poderia ter um efeito prebiótico potencial na modulação da microbiota em longo prazo.

O extrato líquido concentrado de casca de uva pode ser usado como corante natural em formulações de preparados de frutas vermelhas e sorvetes.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar um estudo para o reaproveitamento do resíduo (torta) do processo de extração como outro ingrediente fonte de fibras e com possível uso como corante.
- Investigar a influência das variáveis do processo de extração na bioacessibilidade dos compostos fenólicos do extrato líquido concentrado de casca de uva.
- Avaliar a estabilidade das antocianinas e da cor do extrato líquido concentrado de casca de uva durante um tempo maior de estocagem e sob outras condições.
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato líquido concentrado de casca de uva mediante testes quantitativos como o método da concentração inibitória mínima (CIM).
- Realizar os testes para avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* em sistemas modelos de alimentos contendo o extrato líquido concentrado de casca de uva.
- Aumentar o tempo da fermentação colônica *in vitro* para estudar o efeito do extrato líquido concentrado de casca de uva na atividade metabólica e a modulação da microbiota em longo prazo.
- Realizar mais repetições dos experimentos da digestão e da fermentação colônica *in vitro* e comparar os resultados.
- Realizar testes bioquímicos e moleculares como a técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR) para confirmação das colônias de bactérias da microbiota intestinal.
- Avaliar a biodisponibilidade dos compostos fenólicos do extrato líquido concentrado de casca de uva por meio da avaliação com células tipo Caco 2.
- Avaliar a estabilidade das antocianinas e da cor do preparado de frutas vermelhas submetido a outros métodos de esterilização.
- Identificar e quantificar por CLAE-DAD os compostos derivados da reação de antocianinas e flavanóis com 5-(hidroximetil)furfural e furfural após a esterilização do preparado de frutas vermelhas e a sua influência na preservação da cor.
- Realizar novamente a avaliação sensorial do sorvete após fazer ajustes na formulação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEROUMAND, A. A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, v. 6, n. 1, p. 71-78, 2011.
- ADORNO, M. A. T.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B. A. Development and validation of two methods to quantify volatile acids (C2-C6) by GC/FID: headspace (automatic and manual) and liquid-liquid extraction (LLE). **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 5, n. 07, p. 406-414, 2014.
- ALMINGER, M.; AURA, A. M.; BOHN, T.; DUFOUR, C.; EL, S.; GOMES, A.; KARAKAYA, S.; MARTÍNEZ-CUESTA, M.; MCDUGALL, G.; REQUENA, T. In vitro models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 413-436, 2014.
- AMENDOLA, D.; DE FAVERI, D. M.; SPIGNO, G. Grape marc phenolics: extraction kinetics, quality and stability of extracts. **Journal of Food Engineering**, v. 97, n. 3, p. 384-392, 2010.
- AMICO, V.; NAPOLI, E.; RENDA, A.; RUBERTO, G.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C. Constituents of grape pomace from the Sicilian cultivar Nerello Mascalese. **Food Chemistry**, v. 88, n. 4, p. 599-607, 2004.
- ANVISA, BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 379, de 26 de abril de 1999. Regulamento Técnico referente a Gelados Comestíveis, Preparados, Pós para o Preparo e Bases para Gelados Comestíveis. Diário Oficial da União. Brasília, 1999.
- AOAC (2000) Official Methods of Analysis (17th ed.). Association of Official Analytical Chemists. Washington, USA, 141 p.
- AOAC (2006). Official methods of analysis (14th ed.). Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC (2010). Official methods of analysis (18th ed.). Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists.
- APELBLAT, A. Citric Acid Chemistry. In: **Citric Acid**: Springer, 2014. p. 213-266.
- ARBUCKLE, W. S. **Ice cream**. Springer, 2013. p.483.
- APOLINAR-VALIENTE, R.; ROMERO-CASCALES, I.; GÓMEZ-PLAZA, E.; LÓPEZ-ROCA, J. M.; ROS-GARCÍA, J. M. Cell wall compounds of red grapes skins and their grape marcs from three different winemaking techniques. **Food Chemistry**, v. 187, p. 89-97, 2015.
- ARNOUS, A.; MEYER, A. S. Comparison of methods for compositional characterization of grape (*Vitis vinifera* L.) and apple (*Malus domestica*) skins. **Food and Bioproducts Processing**, v. 86, n. 2, p. 79-86, 2008.
- ARORA, T.; SHARMA, R.; FROST, G. Propionate. Anti-obesity and satiety enhancing factor? **Appetite**, v. 56, n. 2, p. 511-515, 2011.
- AZIZ, N.; FARAG, S.; MOUSA, L.; ABO-ZAID, M. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. **Microbios**, v. 93, n. 374, p. 43-54, 1998.
- BARCIA, M. T.; PERTUZATTI, P. B.; RODRIGUES, D.; GÓMEZ-ALONSO, S.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; GODOY, H. T. Occurrence of low molecular weight phenolics

in *Vitis vinifera* red grape cultivars and their winemaking by-products from São Paulo (Brazil). **Food Research International**, v. 62, p. 500-513, 2014.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.

BIMPILAS, A.; PANAGOPOULOU, M.; TSIMOGIANNIS, D.; OREOPOULOU, V. Anthocyanin copigmentation and color of wine: The effect of naturally obtained hydroxycinnamic acids as cofactors. **Food Chemistry**, v. 197, p. 39-46, 2016.

BLANCO-VEGA, D.; LÓPEZ-BELLIDO, F. J.; ALÍA-ROBLEDO, J. M.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. HPLC–DAD–ESI-MS/MS characterization of pyranoanthocyanins pigments formed in model wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 17, p. 9523-9531, 2011.

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.

BOUAYED, J.; HOFFMANN, L.; BOHN, T. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. **Food Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 14-21, 2011.

BOULTON, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 52, n. 2, p. 67-87, 2001.

BRAZINHA, C.; CADIMA, M.; CRESPO, J. G. Optimization of extraction of bioactive compounds from different types of grape pomace produced at wineries and distilleries. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 6, p. E1142-9, 2014.

BROUILLARD, R.; DELAPORTE, B.; DUBOIS, J. E. Chemistry of anthocyanin pigments. 3. Relaxation amplitudes in pH-jump experiments. **Journal of the American Chemical Society**, v. 100, n. 19, p. 6202-6205, 1978.

CACACE, J. E.; MAZZA, G. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 1, p. 240-248, 2006.

CACACE, J.; MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. **Journal of Food Engineering**, v. 59, n. 4, p. 379-389, 2003.

CALDAS, T. W.; MAZZA, K. E. L.; TELES, A. S. C.; MATTOS, G. N.; BRÍGIDA, A. I. S.; CONTE-JUNIOR, C. A.; BORGUINI, R. G.; GODOY, R. L. O.; CABRAL, L. M. C.; TONON, R. V. Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. **Industrial Crops and Products**, v. 111, n. Supplement C, p. 86-91, 2018.

CARVALHO, A. G. D. S. Estudo da inclusão de antocianinas de extrato da polpa de juçara ("*Euterpe edulis*" Martius) em partículas produzidas por spray drying e gelificação iônica. 2017. 172f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2017.

CAMARGO, U.; PEREIRA, G.; GUERRA, C. Wine grape cultivars adaptation and selection for Tropical regions. **II International Symposium on Tropical Wines** 910, 2010. p.121-129.

CANDIOTI, L. V.; DE ZAN, M. M.; CÁMARA, M. S.; GOICOECHEA, H. C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v. 124, p. 123-138, 2014.

- CASTANEDA-OVANDO, A.; DE LOURDES PACHECO-HERNÁNDEZ, M.; 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.
- CASTILLO-MUÑOZ, N.; FERNÁNDEZ GONZÁLEZ, M.; GÓMEZ-ALONSO, S.; GARCÍA-ROMERO, E.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Red-Color related phenolic composition of Garnacha Tintorera (*Vitis vinifera* L.) grapes and red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 17, p. 7883-91, 2009.
- CASTRO-LÓPEZ, C.; VENTURA-SOBREVILLA, J. M.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, M. D.; ROJAS, R.; ASCACIO-VALDÉS, J. A.; AGUILAR, C. N.; MARTÍNEZ-ÁVILA, G. C. G. Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. **Food Chemistry**, v. 237, p. 1139-1148, 2017.
- CELEP, E.; CHAREHSAZ, M.; AKYÜZ, S.; ACAR, E. T.; YESILADA, E. Effect of in vitro gastrointestinal digestion on the bioavailability of phenolic components and the antioxidant potentials of some Turkish fruit wines. **Food Research International**, v. 78, p. 209-215, 2015.
- CERRUTI, P.; SANTAGATA, G.; D'AYALA, G. G.; AMBROGI, V.; CARFAGNA, C.; MALINCONICO, M.; PERSICO, P. Effect of a natural polyphenolic extract on the properties of a biodegradable starch-based polymer. **Polymer Degradation and Stability**, v. 96, n. 5, p. 839-846, 2011.
- CHANDRASEKARA, A.; SHAHIDI, F. Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated in vitro digestion and microbial fermentation. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 1, p. 226-237, 2012.
- CHAPMAN, S. Guidelines on approaches to the replacement of Tartrazine, Allura Red, Ponceau 4R, Quinoline Yellow, Sunset Yellow and Carmoisine in food and beverages. **STANDARDS, F.**(ed.). Scotland: Crown, 2011.
- CHEN, L.; JIANG, B.; ZHONG, C.; GUO, J.; ZHANG, L.; MU, T.; ZHANG, Q.; BI, X. Chemoprevention of colorectal cancer by black raspberry anthocyanins involved the modulation of gut microbiota and SFRP2 demethylation. **Carcinogenesis**, v. 39, n. 3, p. 471-481, 2018.
- CHOU, P.-H.; MATSUI, S.; MISAKI, K.; MATSUDA, T. Isolation and identification of xenobiotic aryl hydrocarbon receptor ligands in dyeing wastewater. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 2, p. 652-657, 2007.
- CHRIS SOMERS, T.; EVANS, M. E. Grape pigment phenomena: Interpretation of major colour losses during vinification. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 30, n. 6, p. 623-633, 1979.
- CLYDESDALE, F. M.; AHMED, E. Colorimetry—methodology and applications. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 10, n. 3, p. 243-301, 1978.
- COELHO, A. G. Estudo da degradação térmica de antocianinas de extratos de uva (*Vitis vinifera* L. 'Brasil') e jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*). 2011. 98 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação de Química, Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. 2011.
- COELHO, E. M.; DA SILVA PADILHA, C. V.; MISKINIS, G. A.; DE SÁ, A. G. B.; PEREIRA, G. E.; DE AZEVÊDO, L. C.; DOS SANTOS LIMA, M. Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 66, p. 160-167, 2018.

COIMBRA DE SÁ, N.; SALVADOR SILVA, E. M.; SILVA BANDEIRA, A. D. **A cultura da uva e do vinho no Vale do São Francisco**. RDE - Revista de Desenvolvimento Econômico, Ano XVII - Edição especial - Salvador, BA, p. 461 – 491, 2015.

CORREA-BETANZO, J.; ALLEN-VERCOE, E.; MCDONALD, J.; SCHROETER, K.; CORREDIG, M.; PALIYATH, G. Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 165, p. 522-531, 2014.

CORRÊA, R. C.; HAMINIUK, C. W.; BARROS, L.; DIAS, M. I.; CALHELHA, R. C.; KATO, C. G.; CORREA, V. G.; PERALTA, R. M.; FERREIRA, I. C. Stability and biological activity of Merlot (*Vitis vinifera*) grape pomace phytochemicals after simulated in vitro gastrointestinal digestion and colonic fermentation. **Journal of Functional Foods**, v. 36, p. 410-417, 2017.

COSTA, E.; DA SILVA, J. F.; COSME, F.; JORDÃO, A. M. Adaptability of some French red grape varieties cultivated at two different Portuguese terroirs: Comparative analysis with two Portuguese red grape varieties using physicochemical and phenolic parameters. **Food Research International**, v. 78, p. 302-312, 2015.

CUEVA, C.; GIL-SÁNCHEZ, I.; AYUDA-DURÁN, B.; GONZÁLEZ-MANZANO, S.; GONZÁLEZ-PARAMÁS, A.; SANTOS-BUELGA, C.; BARTOLOMÉ, B.; MORENO-ARRIBAS, M. An integrated view of the effects of wine polyphenols and their relevant metabolites on gut and host health. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 99, 2017.

CUEVA, C.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; MONAGAS, M.; WALTON, G. E.; GIBSON, G. R.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; BARTOLOMÉ, B.; MORENO-ARRIBAS, M. V. In vitro fermentation of grape seed flavan-3-ol fractions by human faecal microbiota: changes in microbial groups and phenolic metabolites. **FEMS microbiology ecology**, v. 83, n. 3, p. 792-805, 2013.

ĆUJIĆ, N.; ŠAVIKIN, K.; JANKOVIĆ, T.; PLJEVLJAKUŠIĆ, D.; ZDUNIĆ, G.; IBRIĆ, S. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. **Food Chemistry**, v. 194, p. 135-142, 2016.

DARDEAU, R. **Vinho fino brasileiro**. Rio de Janeiro: Mauad X, 1ra Edição, 2015.

DE LA CERDA-CARRASCO, A.; LÓPEZ-SOLÍS, R.; NUÑEZ-KALASIC, H.; PEÑANEIRA, Á.; OBREQUE-SLIER, E. Phenolic composition and antioxidant capacity of pomaces from four grape varieties (*Vitis vinifera* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 7, p. 1521-1527, 2015.

DE MELLO, L.; DA SILVA, G. Disponibilidade e características de resíduos provenientes da agroindústria de processamento de uva do Rio Grande do Sul. **Embrapa Uva e Vinho- Comunicado Técnico**, 155, 6 p., 2014.

DHEKNEY, S. A. Grapes. In: **Encyclopedia of Food and Health**. Oxford: Academic Press, 2016. p. 261-265.

DILAS, S.; ČANADANOVIĆ-BRUNET, J.; ČETKOVIĆ, G. By-products of fruits processing as a source of phytochemicals. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, v. 15, n. 4, p. 191-202, 2009.

DOS SANTOS CRUXEN, C. E.; HOFFMANN, J. F.; ZANDONÁ, G. P.; FIORENTINI, Â. M.; ROMBALDI, C. V.; CHAVES, F. C. Probiotic butiá (*Butia odorata*) ice cream: Development, characterization, stability of bioactive compounds, and viability of *Bifidobacterium lactis* during storage. **LWT**, v. 75, p. 379-385, 2017.

- 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.
- DUEÑAS, M.; GONZÁLEZ-MANZANO, S.; GONZÁLEZ-PARAMÁS, A.; SANTOS-BUELGA, C. Antioxidant evaluation of O-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 2, p. 443-449, 2010.
- DUEÑAS, M.; CUEVA, C.; MUÑOZ-GONZÁLEZ, I.; JIMÉNEZ-GIRÓN, A.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; SANTOS-BUELGA, C.; MORENO-ARRIBAS, M.; BARTOLOMÉ, B. Studies on modulation of gut microbiota by wine polyphenols: from isolated cultures to omic approaches. **Antioxidants**, v. 4, n. 1, p. 1-21, 2015.
- DUTCOSKY, S. D. Análise sensorial de alimentos. In: (Ed.). **Análise sensorial de alimentos**, 2011.
- ES-SAFI, N.-E.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Study of the reactions between (+)-catechin and furfural derivatives in the presence or absence of anthocyanins and their implication in food color change. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 12, p. 5946-5954, 2000.
- ES-SAFI, N.-E.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Interactions between cyanidin 3-O-glucoside and furfural derivatives and their impact on food color changes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 20, p. 5586-5595, 2002.
- FAILLA, M. L.; CHITCHUMRONCHOKCHAI, C. **In vitro models as tools for screening the relative bioavailabilities of provitamin A carotenoids in foods**. *Harvest Plus Technical Monographs Series 3*. Washington DC: International Food Policy Research Institute, 2005.
- FALGINELLA, L.; DI GASPERO, G.; CASTELLARIN, S. D. Expression of flavonoid genes in the red grape berry of ‘Alicante Bouschet’ varies with the histological distribution of anthocyanins and their chemical composition. **Planta**, v. 236, n. 4, p. 1037-1051, 2012.
- FAVRE, G.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; PICCARDO, D.; GÓMEZ-ALONSO, S.; GONZÁLEZ-NEVES, G. Selectivity of pigments extraction from grapes and their partial retention in the pomace during red-winemaking. **Food Chemistry**, v. 277, p. 391-397, 2019.
- FEKETE, G.; TSABOURI, S. Common food colorants and allergic reactions in children: Myth or reality? **Food Chemistry**, v. 230, p. 578-588, 2017.
- FERREIRA, V.; FERNANDES, F.; CARRASCO, D.; HERNANDEZ, M. G.; PINTO-CARNIDE, O.; ARROYO-GARCÍA, R.; ANDRADE, P.; VALENTÃO, P.; FALCO, V.; CASTRO, I. Spontaneous variation regarding grape berry skin color: A comprehensive study of berry development by means of biochemical and molecular markers. **Food Research International**, v. 97, p. 149-161, 2017.
- FIGUEIREDO-GONZÁLEZ, M.; MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; CANCHO-GRANDE, B.; SANTIAGO, J. L.; MARTÍNEZ, M. C.; SIMAL-GÁNDARA, J. Pattern recognition of three *Vitis vinifera* L. red grapes varieties based on anthocyanin and flavonol profiles, with correlations between their biosynthesis pathways. **Food Chemistry**, v. 130, n. 1, p. 9-19, 2012.
- FIGUEIREDO-GONZÁLEZ, M.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GÁNDARA, J. Garnacha Tintorera-based sweet wines: Chromatic properties and global phenolic composition by means of UV-Vis spectrophotometry. **Food Chemistry**, v. 140, n. 1-2, p. 217-224, 2013.

- FIGUEIREDO-GONZÁLEZ, M.; REGUEIRO, J.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GÁNDARA, J. Garnacha Tintorera-based sweet wines: Detailed phenolic composition by HPLC/DAD–ESI/MS analysis. **Food Chemistry**, v. 143, n. Supplement C, p. 282-292, 2014.
- 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. N. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 38, p. 8987-9003, 2013.
- FOURNIER-LEVEL, A.; HUGUENEY, P.; VERRIÈS, C.; THIS, P.; AGEORGES, A. Genetic mechanisms underlying the methylation level of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera* L.). **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 179, 2011.
- GARCÍA-BENEYTEZ, E.; REVILLA, E.; CABELLO, F. Anthocyanin pattern of several red grape cultivars and wines made from them. **European Food Research and Technology**, v. 215, n. 1, p. 32-37, 2002.
- GAUCHE, C.; MALAGOLI, E. D. S.; BORDIGNON LUIZ, M. T. Effect of pH on the copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts with organic acids. **Scientia Agricola**, v. 67, n. 1, p. 41-46, 2010.
- 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.
- GIÃO, M. S.; GOMES, S.; MADUREIRA, A. R.; FARIA, A.; PESTANA, D.; CALHAU, C.; PINTADO, M. E.; AZEVEDO, I.; MALCATA, F. X. Effect of in vitro digestion upon the antioxidant capacity of aqueous extracts of *Agrimonia eupatoria*, *Rubus idaeus*, *Salvia* sp. and *Satureja montana*. **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 761-767, 2012.
- GIL-SÁNCHEZ, I.; CUEVA, C.; SANZ-BUENHOMBRE, M.; GUADARRAMA, A.; MORENO-ARRIBAS, M. V.; BARTOLOMÉ, B. Dynamic gastrointestinal digestion of grape pomace extracts: Bioaccessible phenolic metabolites and impact on human gut microbiota. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 68, p. 41-52, 2018.
- GIL-SÁNCHEZ, I.; AYUDA-DURÁN, B.; GONZÁLEZ-MANZANO, S.; SANTOS-BUELGA, C.; CUEVA, C.; MARTÍN-CABREJAS, M. A.; SANZ-BUENHOMBRE, M.; GUADARRAMA, A.; MORENO-ARRIBAS, M. V.; BARTOLOMÉ, B. Chemical characterization and in vitro colonic fermentation of grape pomace extracts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 10, p. 3433-3444, 2017.
- GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, 2001.
- 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.
- GOFF, H. D.; HARTEL, R. W. **Ice cream**. Springer. Science & Business Media, 2013.
- GONÇALVES, G. A.; SOARES, A. A.; CORREA, R. C. G.; BARROS, L.; HAMINIUK, C. W. I.; PERALTA, R. M.; FERREIRA, I. C. F. R.; BRACHT, A. Merlot grape pomace hydroalcoholic extract improves the oxidative and inflammatory states of rats with adjuvant-induced arthritis. **Journal of Functional Foods**, v. 33, p. 408-418, 2017.

- GOUVÊA, A. C. M. S.; ARAUJO, M. C. P. D.; SCHULZ, D. F.; PACHECO, S.; GODOY, R. L. D. 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. **Food Science and Technology**, v. 32, n. 1, p. 43-46, 2012.
- GRANZOTTO, A.; ZATTA, P. Resveratrol and Alzheimer's disease: message in a bottle on red wine and cognition. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, p. 95, 2014.
- GUERGOLETTI, K. B.; COSTABILE, A.; FLORES, G.; GARCIA, S.; GIBSON, G. R. In vitro fermentation of juçara pulp (*Euterpe edulis*) by human colonic microbiota. **Food Chemistry**, v. 196, p. 251-258, 2016.
- GUTIÉRREZ, T. J.; HERNIOU-JULIEN, C.; ÁLVAREZ, K.; ALVAREZ, V. A. Structural properties and in vitro digestibility of edible and pH-sensitive films made from guinea arrowroot starch and wastes from wine manufacture. **Carbohydrate Polymers**, v. 184, p. 135-143, 2018.
- HAN, F. L.; XU, Y. Effect of the structure of seven anthocyanins on self-association and colour in an aqueous alcohol solution. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 36, n. 1, p. 105-116, 2015.
- HARRIS, L.; DAESCHEL, M.; STILES, M.; KLAENHAMMER, T. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 52, n. 6, p. 384-387, 1989.
- HARTMANN, A.; PATZ, C.-D.; ANDLAUER, W.; DIETRICH, H.; LUDWIG, M. Influence of processing on quality parameters of strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 20, p. 9484-9489, 2008.
- HE, F.; LIANG, N.-N.; MU, L.; PAN, Q.-H.; WANG, J.; REEVES, M. J.; DUAN, C.-Q. Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. **Molecules**, v. 17, n. 2, p. 1571-1601, 2012.
- HERNÁNDEZ-HERRERO, J.; FRUTOS, M. Colour and antioxidant capacity stability in grape, strawberry and plum peel model juices at different pHs and temperatures. **Food Chemistry**, v. 154, p. 199-204, 2014.
- HIDALGO, M.; ORUNA-CONCHA, M. J.; KOLIDA, S.; WALTON, G. E.; KALLITHRAKA, S.; SPENCER, J. P.; DE PASCUAL-TERESA, S. Metabolism of anthocyanins by human gut microflora and their influence on gut bacterial growth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 15, p. 3882-3890, 2012.
- HOGAN, S.; CANNING, C.; SUN, S.; SUN, X.; ZHOU, K. Effects of grape pomace antioxidant extract on oxidative stress and inflammation in diet induced obese mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 21, p. 11250-11256, 2010.
- HOSSEINI, E.; GROOTAERT, C.; VERSTRAETE, W.; VAN DE WIELE, T. Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. **Nutrition Reviews**, v. 69, n. 5, p. 245-258, 2011.
- IBRAHIM, S. A. Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: Other Species. 2016.
- JIMÉNEZ-GIRÓN, A.; MUÑOZ-GONZÁLEZ, I.; MARTÍNLVAREZ, P. J.; MORENO-ARRIBAS, M. V.; BARTOLOMÉ, B. Towards the fecal metabolome derived from moderate red wine intake. **Metabolites**, v. 4, n. 4, p. 1101-1118, 2014.
- JUBILEU, B. D. S.; SATO, A. J.; ROBERTO, S. R. Phenological and productive characterization out of season of Cabernet Sauvignon and Alicante (*Vitis vinifera* L.)

grapevines in the north of Paraná. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 451-462, 2010.

KAMILOGLU, S.; PASLI, A. A.; OZCELIK, B.; VAN CAMP, J.; CAPANOGLU, E. Influence of different processing and storage conditions on in vitro bioaccessibility of polyphenols in black carrot jams and marmalades. **Food Chemistry**, v. 186, p. 74-82, 2015.

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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 14, p. 4360-4367, 2004.

KAMMERER, D. R.; KAMMERER, J.; VALET, R.; CARLE, R. Recovery of polyphenols from the by-products of plant food processing and application as valuable food ingredients. **Food Research International**, v. 65, p. 2-12, 2014.

KARAMAN, S.; TOKER, Ö. S.; YÜKSEL, F.; ÇAM, M.; KAYACIER, A.; DOGAN, M. Physicochemical, bioactive, and sensory properties of persimmon-based ice cream: Technique for order preference by similarity to ideal solution to determine optimum concentration. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 1, p. 97-110, 2014.

KATALINIĆ, V.; MOŽINA, S. S.; SKROZA, D.; GENERALIĆ, I.; ABRAMOVIĆ, H.; MILOŠ, M.; LJUBENKOV, I.; PISKERNIK, S.; PEZO, I.; TERPINC, P. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 715-723, 2010.

KIRCA, A.; ÖZKAN, M.; CEMEROĞLU, B. Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. **Food Chemistry**, v. 97, n. 4, p. 598-605, 2006.

KOCABEY, N.; YILMAZTEKIN, M.; HAYALOGLU, A. A. Effect of maceration duration on physicochemical characteristics, organic acid, phenolic compounds and antioxidant activity of red wine from *Vitis vinifera* L. Karaoglan. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 9, p. 3557-3565, 2016.

KUCK, L. S.; WESOLOWSKI, J. L.; NOREÑA, C. P. Z. Effect of temperature and relative humidity on stability following simulated gastro-intestinal digestion of microcapsules of Bordo grape skin phenolic extract produced with different carrier agents. **Food Chemistry**, v. 230, p. 257-264, 2017.

KUMAR, V.; CHATLI, M. K.; WAGH, R. V.; MEHTA, N.; KUMAR, P. Effect of the combination of natural antioxidants and packaging methods on quality of pork patties during storage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 6230-6241, 2015.

KY, I.; LORRAIN, B.; KOLBAS, N.; CROZIER, A.; TEISSEDRE, P.-L. Wine by-products: phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different French grape varieties. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 482-506, 2014.

LANDETE, J. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1150-1160, 2011.

LI, D.; WANG, P.; LUO, Y.; ZHAO, M.; CHEN, F. Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: Update from recent decade. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 8, p. 1729-1741, 2017.

LIANG, L.; WU, X.; ZHAO, T.; ZHAO, J.; LI, F.; ZOU, Y.; MAO, G.; YANG, L. In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea*

- Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion. **Food Research International**, v. 46, n. 1, p. 76-82, 2012.
- LIANG, Z.; SANG, M.; FAN, P.; WU, B.; WANG, L.; YANG, S.; LI, S. CIELAB coordinates in response to berry skin anthocyanins and their composition in Vitis. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 3, p. C490-C497, 2011.
- LILA, M. A.; RIBNICKY, D. M.; ROJO, L. E.; ROJAS-SILVA, P.; OREN, A.; HAVENAAR, R.; JANLE, E. M.; RASKIN, I.; YOUSEF, G. G.; GRACE, M. H. Complementary approaches to gauge the bioavailability and distribution of ingested berry polyphenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 23, p. 5763-5771, 2011.
- LIMBO, S.; PIERGIOVANNI, L. Shelf life of minimally processed potatoes: Part 1. Effects of high oxygen partial pressures in combination with ascorbic and citric acids on enzymatic browning. **Postharvest biology and technology**, v. 39, n. 3, p. 254-264, 2006.
- LINGUA, M. S.; FABANI, M. P.; WUNDERLIN, D. A.; BARONI, M. V. From grape to wine: Changes in phenolic composition and its influence on antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 208, p. 228-238, 2016a.
- 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, 2016b.
- LINGUA, M. S.; WUNDERLIN, D. A.; BARONI, M. V. Effect of simulated digestion on the phenolic components of red grapes and their corresponding wines. **Journal of Functional Foods**, v. 44, p. 86-94, 2018.
- LOUIS, P.; FLINT, H. J. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. **FEMS Microbiology Letters**, v. 294, n. 1, p. 1-8, 2009.
- LUCENA, A. P. S.; NASCIMENTO, R. J. B.; MACIEL, J. A. C.; TAVARES, J. X.; BARBOSA-FILHO, J. M.; OLIVEIRA, E. J. Antioxidant activity and phenolics content of selected Brazilian wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 1, p. 30-36, 2010.
- MACFARLANE, G. T. The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function. In: S. F. Phillips, J. H. Pemberton, and R. G. Shorter (ed.), *The large intestine: physiology, pathophysiology and disease*. Raven Press, New York, N.Y., p. 51-92, 1991.
- MALIEN-AUBERT, C.; DANGLES, O.; AMIOT, M. J. Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 170-176, 2001.
- MARKAKIS, P. **Anthocyanins as Food Colors**. Elsevier, 2012.
- MARSHALL, R. T.; GOFF, H. D.; HARTEL, R. W. **Ice cream**. Springer, 2012.
- MARTÍN-CARRÓN, N.; GONI, I. Prior exposure of cecal microflora to grape pomaces does not inhibit in vitro fermentation of pectin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 1064-1070, 1998.
- MCDOUGALL, G. J.; DOBSON, P.; SMITH, P.; BLAKE, A.; STEWART, D. Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 15, p. 5896-5904, 2005.

MCDUGALL, G. J.; FYFFE, S.; DOBSON, P.; STEWART, D. Anthocyanins from red cabbage – stability to simulated gastrointestinal digestion. **Phytochemistry**, v. 68, n. 9, p. 1285-1294, 2007.

MENDES, J. A. S.; PROZIL, S. O.; EVTUGUIN, D. V.; LOPES, L. P. C. Towards comprehensive utilization of winemaking residues: Characterization of grape skins from red grape pomaces of variety Touriga Nacional. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 25-32, 2013.

MILLER, T. L.; WOLIN, M. J. Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1589-1592, 1996.

MOLONEY, M.; ROBBINS, R. J.; COLLINS, T. M.; KONDO, T.; YOSHIDA, K.; DANGLES, O. Red cabbage anthocyanins: The influence of d-glucose acylation by hydroxycinnamic acids on their structural transformations in acidic to mildly alkaline conditions and on the resulting color. **Dyes and Pigments**, 2018.

MOSELE, J.; MACIÀ, A.; MOTILVA, M.-J. Metabolic and microbial modulation of the large intestine ecosystem by non-absorbed diet phenolic compounds: a review. **Molecules**, v. 20, n. 9, p. 17429-17468, 2015.

MUKAKA, M. M. A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. **Malawi Medical Journal**, v. 24, n. 3, p. 69-71, 2012.

MUÑOZ-GONZÁLEZ, I.; JIMÉNEZ-GIRÓN, A.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; BARTOLOMÉ, B.; MORENO-ARRIBAS, M. V. Profiling of Microbial-Derived Phenolic Metabolites in Human Feces after Moderate Red Wine Intake. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 39, p. 9470-9479, 2013.

NASCIMENTO, L. D. S.; SANTIAGO, M. D. A.; OLIVEIRA, E.; BORGUINI, R.; BRAGA, E.; MARTINS, V.; PACHECO, S.; SOUZA, M.; GODOY, R. D. O. Characterization of Bioactive Compounds in *Eugenia brasiliensis*, Lam.(Grumixama). **Nutrition and Food Technology**, v. 3, n. 3, pp. 1–7, 2017.

NASSIRI-ASL, M.; HOSSEINZADEH, H. Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its bioactive constituents: an update. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 9, p. 1392-1403, 2016.

NOHYNEK, L. J.; ALAKOMI, H.-L.; KÄHKÖNEN, M. P.; HEINONEN, M.; HELANDER, I. M.; OKSMAN-CALDENTY, K.-M.; PUUPPONEN-PIMIÄ, R. H. Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. **Nutrition and Cancer**, v. 54, n. 1, p. 18-32, 2006.

NYANGALE, E. P.; FARMER, S.; KELLER, D.; CHERNOFF, D.; GIBSON, G. R. Effect of prebiotics on the fecal microbiota of elderly volunteers after dietary supplementation of *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086. **Anaerobe**, v. 30, p. 75-81, 2014.

OIV. **Statistical Report on World Vitiviniculture**. International Organization of Vine and Wine. 2017. Disponível em: < <http://www.oiv.int/public/medias/5479/oiv-en-bilan-2017.pdf> >. Acesso em 01 julho de 2017.

OLIVEIRA, D. A.; SALVADOR, A. A.; SMÂNIA JR, A.; SMÂNIA, E. F.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, S. R. Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera* L.) pomace extracts obtained by supercritical fluids. **Journal of Biotechnology**, v. 164, n. 3, p. 423-432, 2013.

- OOMEN, A.; ROMPELBERG, C.; BRUIL, M.; DOBBE, C.; PEREBOOM, D.; SIPS, A. Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 0281-0287, 2003.
- OZDAL, T.; SELA, D. A.; XIAO, J.; BOYACIOGLU, D.; CHEN, F.; CAPANOGLU, E. The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 78, 2016.
- PADILHA, A. C. T.; BIASOTO, L. C.; CORRÊA, M. D. S.; LIMA, G. E.; PEREIRA. Phenolic compounds profile and antioxidant activity of commercial tropical red wines (*Vitis vinifera* L.) from São Francisco Valley, Brazil. **Journal of Food Biochemistry**, p. 1-9, 2016.
- PAPADOPOULOU, C.; SOULTI, K.; ROUSSIS, I. G. Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, n. 1, p. 41-46, 2005.
- PATHARE, P. B.; OPARA, U. L.; AL-SAID, F. A.-J. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 1, p. 36-60, 2013.
- PATRAS, A.; BRUNTON, N. P.; O'DONNELL, C.; TIWARI, B. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 1, p. 3-11, 2010.
- PATRAS, A.; BRUNTON, N. P.; TIWARI, B.; BUTLER, F. Stability and degradation kinetics of bioactive compounds and colour in strawberry jam during storage. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 7, p. 1245-1252, 2011.
- PEIXOTO, F. M.; FERNANDES, I.; GOUVÊA, A. C. M.; SANTIAGO, M. C.; BORGUINI, R. G.; MATEUS, N.; FREITAS, V.; GODOY, R. L.; FERREIRA, I. M. Simulation of in vitro digestion coupled to gastric and intestinal transport models to estimate absorption of anthocyanins from peel powder of jaboticaba, jamelão and jambo fruits. **Journal of Functional Foods**, v. 24, p. 373-381, 2016.
- PEREIRA, G. E.; PADILHA, C. V. S.; BIASOTO, A. C. T.; CANUTO, K. M.; NASCIMENTO, A. M.; SOUZA, J. F. Le poids des consommateurs sur évolution des vins: l'exemple de la Vallée du São Francisco, Brésil. In: PÉRARD, J., PERROT, M. (ORG.) (Ed.). **Vin et civilisation. Les étapes de l'humanisation**. 1st. Dijon: Centre Georges Chevrier, v.9, p. 301-310, 2016.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, n. 7, p. 791-800, 2006.
- PEREZ-LOCAS, C.; YAYLAYAN, V. The Maillard reaction and food quality deterioration. In: (Ed.). **Chemical deterioration and physical instability of food and beverages**: Elsevier, 2010. p.70-94.
- PÉREZ-VICENTE, A.; GIL-IZQUIERDO, A.; GARCÍA-VIGUERA, C. In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 8, p. 2308-2312, 2002.
- PINELO, M.; RUBILAR, M.; JEREZ, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, M. J. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2111-2117, 2005.

- PIWOWARSKI, J. P.; GRANICA, S.; KISS, A. K. Influence of Gut Microbiota-Derived Ellagitannins' Metabolites Urolithins on Pro-Inflammatory Activities of Human Neutrophils. **Planta Medica**, v. 80, n. 11, p. 887-895, 2014.
- PODSEDEK, A.; REDZY尼亚, M.; KLEWICKA, E.; KOZIOŁKIEWICZ, M. Matrix effects on the stability and antioxidant activity of red cabbage anthocyanins under simulated gastrointestinal digestion. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- PROTAS, J. D. S.; CAMARGO, U. A. Vitivinicultura brasileira: panorama setorial em 2010. **Embrapa Uva e Vinho-Livro técnico**, 110 p., Brasília, DF: SEBRAE; Bento Gonçalves: IBRAVIN: Embrapa Uva e Vinho, 2011.
- QUAVE, C. L.; ESTÉVEZ-CARMONA, M.; COMPADRE, C. M.; HOBBY, G.; HENDRICKSON, H.; BEENKEN, K. E.; SMELTZER, M. S. Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics. **PLOS One**, v. 7, n. 1, p. e28737, 2012.
- 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.
- REICHARDT, N.; DUNCAN, S. H.; YOUNG, P.; BELENGUER, A.; MCWILLIAM LEITCH, C.; SCOTT, K. P.; FLINT, H. J.; LOUIS, P. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. **The ISME Journal**, v. 8, p. 1323, 2014.
- REVILLA, E.; GARCIA-BENEYTEZ, E.; CABELLO, F.; MARTÍN-ORTEGA, G.; RYAN, J.-M. A. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. **Journal of Chromatography a**, v. 915, n. 1-2, p. 53-60, 2001.
- REVILLA, E.; LOSADA, M. M.; GUTIÉRREZ, E. Phenolic Composition and Color of Single Cultivar Young Red Wines Made with Mencia and Alicante-Bouschet Grapes in AOC Valdeorras (Galicia, NW Spain). **Beverages**, v. 2, n. 3, p. 18, 2016.
- RIBEIRO, T. P.; ALVES, R. E.; GONÇALVES, A. L. D. S.; SOUZA, A. P. C. Chemical characterization of winemaking byproducts from grape varieties cultivated in Vale do São Francisco, Brazil. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 4, 2018.
- RIBEREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. **The chemistry of wine stabilization and treatments**. In: Handbook of Enology, vol 2, 2nd Ed., Wiley, New York, 2006.
- RICHARDSON, A. J.; MCKAIN, N.; WALLACE, R. J. Ammonia production by human faecal bacteria, and the enumeration, isolation and characterization of bacteria capable of growth on peptides and amino acids. **BMC microbiology**, v. 13, n. 1, p. 6, 2013.
- RILEY, T. Clostridium: Gas gangrene; tetanus; food poisoning; pseudomembranous colitis. In: (Ed.). **Medical Microbiology**: Elsevier, 2012. p. 245-255.
- ROCKENBACH, I. I.; GONZAGA, L. V.; RIZELIO, V. M.; GONÇALVES, A. E. D. S. S.; GENOVESE, M. I.; FETT, R. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 897-901, 2011.
- 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.

RUÍZ-GARCÍA, Y.; BERES, C.; CHÁVEZ, D. W. H.; SOUZA, E. F.; TONON, R. V.; CABRAL, L. M. C. Influence of processing conditions on bioactive compound extraction from *Vitis vinifera* L. var. Alicante Bouschet grape skin. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 1066-1072, 2019.

RUSSELL, W. R.; HOYLES, L.; FLINT, H. J.; DUMAS, M.-E. Colonic bacterial metabolites and human health. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 246-254, 2013.

SAGDIC, O.; OZTURK, I.; KISI, O. Modeling antimicrobial effect of different grape pomace and extracts on *S. aureus* and *E. coli* in vegetable soup using artificial neural network and fuzzy logic system. **Expert Systems with Applications**, v. 39, n. 8, p. 6792-6798, 2012.

SALAZAR, N.; GUEIMONDE, M.; HERNÁNDEZ-BARRANCO, A. M.; RUAS-MADIEDO, P.; CLARA, G. Exopolysaccharides produced by intestinal Bifidobacterium strains act as fermentable substrates for human intestinal bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 15, p. 4737-4745, 2008.

SANT'ANNA, V.; BRANDELLI, A.; MARCZAK, L. D. F.; TESSARO, I. C. Kinetic modeling of total polyphenol extraction from grape marc and characterization of the extracts. **Separation and Purification Technology**, v. 100, p. 82-87, 2012.

SANT'ANNA, V.; GURAK, P. D.; MARCZAK, L. D. F.; TESSARO, I. C. Tracking bioactive compounds with colour changes in foods—A review. **Dyes and Pigments**, v. 98, n. 3, p. 601-608, 2013.

SANTIAGO, M. D. A.; GOUVÊA, A.; GODOY, R. D. O.; OIANO NETO, J.; PACHECO, S. Adaptação de um método por cromatografia líquida de alta eficiência para análise de antocianinas em suco de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.). **Embrapa Agroindústria de Alimentos-Comunicado Técnico**, 2010.

SCHULZ, M.; SERAGLIO, S. K. T.; DELLA BETTA, F.; NEHRING, P.; VALESE, A. C.; DAGUER, H.; GONZAGA, L. V.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Blackberry (*Rubus ulmifolius* Schott): Chemical composition, phenolic compounds and antioxidant capacity in two edible stages. **Food Research International**, 2019.

SCHWARTZ, S.; VON ELBEE, J.; GIUSTI, M. Corantes. In: **Química de Alimentos de Fennema**: Artmed (Ed.), Porto Alegre, 2010. p. 445-498.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SMERIGLIO, A.; BARRECA, D.; BELLOCCO, E.; TROMBETTA, D. Chemistry, pharmacology and health benefits of anthocyanins. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 8, p. 1265-1286, 2016.

SOARES, J. M.; LEÃO, P. D. S. **A vitivinicultura no Semiárido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2009.

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; DE FAVERI, D. M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 200-208, 2007.

SPIGNO, G.; MARINONI, L.; GARRIDO, G. D. State of the art in grape processing by-products. In: **Handbook of Grape Processing By-Products**: Elsevier (Ed.), 2017. p. 1-27.

SRINIVAS, K.; KING, J.; MONRAD, J.; HOWARD, L.; ZHANG, D. Pressurized solvent extraction of flavonoids from grape pomace utilizing organic acid additives. **Italian Journal of Food Science**, v. 23, n. 1, p. 90-105, 2011.

STINTZING, F. C.; STINTZING, A. S.; CARLE, R.; FREI, B.; WROLSTAD, R. E. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 6172-6181, 2002.

TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E.; BERTOLINI, D.; CONTE, A. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 599-606, 2010.

TANG, K.; LIU, T.; HAN, Y.; XU, Y.; LI, J. The importance of monomeric anthocyanins in the definition of wine colour properties. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 38, n. 1, p. 1-10, 2017.

TEIXEIRA-NETO, A. A.; SHIGUIHARA, A. L.; IZUMI, C. M.; BIZETO, M. A.; LEROUX, F.; TEMPERINI, M. L. A.; CONSTANTINO, V. R. L. A hybrid material assembled by anthocyanins from açai fruit intercalated between niobium lamellar oxide. **Dalton Transactions**, n. 21, p. 4136-4145, 2009.

TESAKI, S.; TANABE, S.; MORIYAMA, M.; FUKUSHI, E.; KAWABATA, J.; WATANABE, M. Isolation and identification of an antibacterial compound from grape and its application to foods. **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan (Japan)**, 1999.

TOLHURST, G.; HEFFRON, H.; LAM, Y. S.; PARKER, H. E.; HABIB, A. M.; DIAKOGIANNAKI, E.; CAMERON, J.; GROSSE, J.; REIMANN, F.; GRIBBLE, F. M. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. **Diabetes**, v. 61, n. 2, p. 364-371, 2012.

TORCHIO, F.; SEGADE, S. R.; GERBI, V.; CAGNASSO, E.; ROLLE, L. Changes in chromatic characteristics and phenolic composition during winemaking and shelf-life of two types of red sweet sparkling wines. **Food Research International**, v. 44, n. 3, p. 729-738, 2011.

TOURNOUR, H. H.; SEGUNDO, M. A.; MAGALHÃES, L. M.; BARREIROS, L.; QUEIROZ, J.; CUNHA, L. M. Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties. **Industrial Crops and Products**, v. 74, n. Supplement C, p. 397-406, 2015.

TRIKAS, E. D.; MELIDOU, M.; PAPI, R. M.; ZACHARIADIS, G. A.; KYRIAKIDIS, D. A. Extraction, separation and identification of anthocyanins from red wine by-product and their biological activities. **Journal of Functional Foods**, v. 25, p. 548-558, 2016.

TURKER, N.; AKSAY, S.; EKIZ, H. İ. Effect of storage temperature on the stability of anthocyanins of a fermented black carrot (*Daucus carota* var. L.) beverage: shalgam. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 12, p. 3807-3813, 2004.

TÜRKYİLMAZ, M.; YEMİŞ, O.; ÖZKAN, M. Clarification and pasteurisation effects on monomeric anthocyanins and percent polymeric colour of black carrot (*Daucus carota* L.) juice. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 1052-1058, 2012.

TZOUNIS, X.; VULEVIC, J.; KUHNLE, G. G.; GEORGE, T.; LEONCZAK, J.; GIBSON, G. R.; KWIK-URIBE, C.; SPENCER, J. P. Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora. **British Journal of Nutrition**, v. 99, n. 4, p. 782-792, 2008.

- VINCE, A. J.; BURRIDGE, S. M. Ammonia production by intestinal bacteria: the effects of lactose, lactulose and glucose. **Journal of Medical Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 177-191, 1980.
- VITAL, A. C. P.; SANTOS, N. W.; MATUMOTO-PINTRO, P. T.; DA SILVA SCAPIM, M. R.; MADRONA, G. S. Ice cream supplemented with grape juice residue as a source of antioxidants. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, n. 1, p. 183-189, 2018.
- VOSS, D. H. Relating colorimeter measurement of plant color to the Royal Horticultural Society Colour Chart. **HortScience**, v. 27, n. 12, p. 1256-1260, 1992.
- WANG, J.; WANG, J.; YE, J.; VANGA, S. K.; RAGHAVAN, V. Influence of high-intensity ultrasound on bioactive compounds of strawberry juice: Profiles of ascorbic acid, phenolics, antioxidant activity and microstructure. **Food Control**, v. 96, p. 128-136, 2019.
- WANG, W. D.; XU, S. Y. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. **Journal of Food Engineering**, v. 82, n. 3, p. 271-275, 2007.
- WANG, Z.; ZHANG, M.; WU, Q. Effects of temperature, pH, and sunlight exposure on the color stability of strawberry juice during processing and storage. **LWT-Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 1174-1178, 2015a.
- WANG, Z.; ZHANG, M.; WU, Q. Effects of temperature, pH, and sunlight exposure on the color stability of strawberry juice during processing and storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, Part 2, p. 1174-1178, 2015b.
- WHITE, B. L.; HOWARD, L. R.; PRIOR, R. L. Impact of different stages of juice processing on the anthocyanin, flavonol, and procyanidin contents of cranberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4692-4698, 2011.
- WROLSTAD, R. E.; DURST, R. W.; LEE, J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 9, p. 423-428, 2005.
- WRONG, O. M.; VINCE, A. Urea and ammonia metabolism in the human large intestine. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 43, n. 1, p. 77-86, 1984.
- WU, Z.; WU, A.; DONG, J.; SIGEARS, A.; LU, B. Grape skin extract improves muscle function and extends lifespan of a Drosophila model of Parkinson's disease through activation of mitophagy. **Experimental Gerontology**, v. 113, p. 10-17, 2018.
- YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 1, p. 41-48, 2006.
- YOU, Y.; LI, N.; HAN, X.; GUO, J.; ZHAO, Y.; LIU, G.; HUANG, W.; ZHAN, J. Influence of different sterilization treatments on the color and anthocyanin contents of mulberry juice during refrigerated storage. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 48, p. 1-10, 2018.
- ZERBIB, M.; MAZAURIC, J.P.; MEUDEC, E.; LE GUERNEVÉ, C.; LEPAK, A.; NIDETZKY, B.; CHEYNIER, V.; TERRIER, N.; SAUCIER, C. New flavanol O-glycosides in grape and wine. **Food Chemistry**, v. 266, p. 441-448, 2018.
- ZHANG, X.K.; HE, F.; ZHANG, B.; REEVES, M. J.; LIU, Y.; ZHAO, X.; DUAN, C. Q. The effect of prefermentative addition of gallic acid and ellagic acid on the red wine color, copigmentation and phenolic profiles during wine aging. **Food Research International**, v. 106, p. 568-579, 2018.

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.