



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS



**Otimização da extração de polifenóis do resíduo de uva e sua estabilidade durante  
armazenamento**

LARRY OSCAR CHAÑI PAUCAR

Recife  
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

LARRY OSCAR CHAÑI PAUCAR

**Otimização da extração de polifenóis do resíduo de uva e sua estabilidade durante  
armazenamento**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADORA: Profa. Dra. VERA LÚCIA ARROXELAS GALVÃO DE LIMA

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA INÊS SUCUPIRA MACIEL

Recife

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

**Otimização da extração de polifenóis do resíduo de uva e sua estabilidade durante  
armazenamento**

**Por**

LARRY OSCAR CHAÑI PAUCAR

Esta dissertação foi julgada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em \_\_/\_\_/\_\_ pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimento em sua forma final.

Banca Examinadora:

---

Profa Dra. Enayde de Almeida Melo  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Profa Dra. Samara Alvachian Cardoso Andrade  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profa Dra. Silvana Magalhães Salgado  
Universidade Federal de Pernambuco

## **DEDICATÓRIA**

A Deus, ao meu pai, em especial a minha filha Nailza porque desde seu nascimento passou a ser minha maior motivação e inspiração.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela fortaleza, por iluminar meu caminho e me permitir concluir mais uma etapa na minha vida acadêmica. E por me permitir conhecer nesse tempo pessoas maravilhosas.

Ao meu pai Máximo E. Chañi Tacca pela constante motivação e pelo seu exemplo de perseverança. Aos meus irmãos Yuri, Esmeralda, Yanet e Max pelo seu apoio constante e sua presença na minha vida.

A minha esposa Sonialuz Cutipa Quico pelo presente mais maravilhoso que alguém já deu para mim, a minha filha Nailza, que é a força que motiva minhas ações.

As minhas orientadoras, Profa. Vera Arroxelas e a Profa. Maria Inês S. Maciel pelo seu apoio constante na execução do meu trabalho de dissertação.

Aos meus professores e professoras do curso de mestrado, por disponibilizar seus conhecimentos na minha formação como mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aos meus amigos Wesley Silva e Flávio Neves pelo sua amizade e seu apoio na minha estadia no Recife.

Aos meus colegas do curso pela sua amizade e por compartilhar suas experiências profissionais.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade de cursar a Pós-graduação no Brasil e por todos os benefícios que me proporcionaram como estudante.

Ao Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal (CAPES) pela bolsa de estudo concedida que me permitiu concluir o curso de Mestrado.

À Organização dos Estados Americanos (OEA) e ao Grupo Coimbra das Universidades Brasileiras (GCUB), pelo auspício da bolsa acadêmica de pós-graduação.

À Empresa de Polpa de Frutas Canaã, por disponibilizar o resíduo agroindustrial de uva cv. Isabel, principal material de estudo desta pesquisa.

## RESUMO

O processamento de suco de frutas é um setor da indústria de alimentos que produz abundante resíduo. Nas investigações recentes destacam-se esses resíduos agroindustriais como fontes potenciais de fitoquímicos bioativos. Por esse motivo, a pesquisa teve como objetivo extrair polifenóis de resíduo de uva e avaliar sua estabilidade durante armazenamento. As extrações foram realizadas seguindo o delineamento experimental Box-Behnken ajustado a três variáveis, temperatura, razão sólido/líquido e tempo. O teor de antocianinas, flavonóis e fenólicos totais dos extratos foram quantificados e analisados pela metodologia de superfície de resposta para determinar sua dependência às variáveis em estudo. A otimização de múltiplas respostas foi executada com a função de *desirability* para maximizar a extração. O extrato obtido com os parâmetros otimizados foi concentrado, armazenado por 83 dias à temperatura de 4°C e, periodicamente, foi determinado o teor de antocianinas monoméricas e a porcentagem de cor polimérica. Com esses dados foram modeladas as cinéticas de reação. Adicionalmente determinou-se as características físico-químicas e cromáticas do extrato otimizado concentrado. O resultado da otimização de extração demonstrou que a temperatura de 60°C, a razão sólido:líquido de 1/25 g.mL<sup>-1</sup> e um tempo de 80 minutos, maximizaram a recuperação de antocianinas totais (30,96 mg.100g<sup>-1</sup>), de flavonóis totais (73,34 mg.100g<sup>-1</sup>) e fenólicos totais (856,78 mg EAG.100g<sup>-1</sup>). Essas condições foram determinadas para uma *desirability* global (*D*) de 0,77. O extrato otimizado concentrado mostrou teor de sólidos solúveis de 34,07 °Brix; antocianinas monoméricas de 39,95 mg.L<sup>-1</sup>; flavonóis totais de 118,49 mg.L<sup>-1</sup>; fenólicos totais de 2.257,44 mg EAG.L<sup>-1</sup>; cor polimérica de 46,63%; atividade de água de 0,94; pH de 2,14; e a cor com luminosidade (L\*) de 24,32; componente vermelho (a\*) de 26,32 e componente amarelo (b\*) de 5,14. O estudo da estabilidade indicou que tanto a degradação de antocianinas quanto a geração da cor polimérica seguem uma cinética de primeira ordem, com taxas de reação (*k*) de 4,10x10<sup>-3</sup> dias<sup>-1</sup> e 3,46x10<sup>-3</sup> dias<sup>-1</sup>, respectivamente. A degradação das antocianinas em 50%, ou seja, o tempo de meia vida (t<sub>1/2</sub>) ocorreria aos 169 dias de armazenagem. Em conclusão, o etanol acidificado com ácido cítrico pode ser utilizado com eficiência para extrair polifenóis de resíduos de uvas, com uma estabilidade razoável que permitiria armazená-lo para uso posterior como aditivo natural.

**Palavras-chave:** Fitoquímicos, Antocianinas, desenho Box-Behnken, Cor polimérica

## ABSTRACT

Fruit juice processing is a sector of the food industry that produces abundant waste. Recent research has highlighted these agroindustrial residues as potential sources of bioactive phytochemicals. For this reason, the research aimed to extract polyphenols from grape residue and evaluate their stability during storage. The extractions were performed with ethanol acidified with citric acid according to the Box-Behnken design adjusted to three variables, temperature, solid/liquid ratio and time. The total anthocyanins content, total flavonols and total phenolics of the extracts were quantified and analyzed by the response surface methodology to determine their dependence on the variables under study. The multiple response optimization was performed with the desirability function to maximize the extraction. The extract obtained with the optimized parameters was concentrated, stored for 83 days at 4°C, and periodically the content of monomeric anthocyanins and the percentage of polymeric color were determined. With this data the reaction kinetics were modeled. Additionally, the physicochemical and chromatic characteristics of the concentrated optimized extract were determined. The result of the optimization of extraction showed that the temperature of 60°C, the solid:liquid ratio of 1/25 g.mL<sup>-1</sup> and a time of 80 minutes, maximized the recovery of total anthocyanins (30.96 mg.100g<sup>-1</sup>), total flavonols (73.34 mg.100g<sup>-1</sup>) and total phenolics (856.78 mg EAG.100g<sup>-1</sup>). These conditions were determined for a global desirability (D) of 0.77. The optimized concentrate extract showed soluble solids content of 34.07 °Brix; total anthocyanins of 39.95 mg.L<sup>-1</sup>; total flavonols of 118.49 mg.L<sup>-1</sup>; total phenolics of 2,257.44 mg EAG.L<sup>-1</sup>; polymeric color of 46.63%; water activity of 0.94; pH of 2.14; and the color with luminosity (L \*) of 24.32; red component (a\*) of 26.32 and yellow component (b\*) of 5.14. The stability study indicated that both anthocyanin degradation and polymeric color generation follow first order kinetics, with reaction rates (k) of 4.10 x 10<sup>-3</sup> day<sup>-1</sup> and 3.46 x 10<sup>-3</sup> day<sup>-1</sup>, respectively. The degradation of anthocyanins by 50 %, ie the half-life (t<sub>1/2</sub>) would occur at 169 days of storage. In conclusion, ethanol acidified with citric acid can be efficiently used to extract polyphenols from grape residues, with a reasonable stability that would allow it to be stored for later use as a natural additive.

**Key Words:** Phytochemicals, Anthocyanins, Box-Behnken design, Polymeric color

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Principais países produtores de uva a nível mundial .....	17
<b>Figura 2.</b>	Evolução do valor econômico da produção de uva no Brasil .....	17
<b>Figura 3.</b>	Principais países produtores de vinho .....	18
<b>Figura 4.</b>	Diagrama do processo de vinificação incluindo a geração de resíduos .....	19
<b>Figura 5.</b>	Estrutura do esqueleto carbônico de alguns flavonoides mais frequentes...	21
<b>Figura 6.</b>	Estrutura do cátion 2-fenilbenzopirona .....	22
<b>Figura 7.</b>	Estrutura da Malvidina 3-O-glucosídeo .....	24
<b>Figura 8.</b>	Formas estruturais da antocianina devido ao pH .....	26
<b>Figura 9.</b>	Espectros de absorção de delphinidina-3-glicosídeo em diferentes pH .....	27
<b>Figura 10.</b>	Processo de escurecimento enzimático em mostos de vinhos .....	28
<b>Figura 11.</b>	Ação catalítica proposta de íons de ferro e de cobre na oxidação de catecóis para produzir quinonas e peróxido de hidrogênio .....	28
<b>Figura 12.</b>	Superfície de resposta tridimensional .....	29
<b>Figura 13.</b>	Gráfico de contorno do ponto estacionário máximo .....	30
<b>Figura 14.</b>	Gráfico de contorno ponto estacionário mínimo .....	31
<b>Figura 15.</b>	Gráfico de contorno do ponto estacionário de cadeira .....	31
<b>Figura 16.</b>	Desenho Box-Behnken para três variáveis .....	32

### ARTIGO:

<b>Figura 1.</b>	Fluxograma da elaboração de extrato otimizado concentrado do resíduo de uva .....	57
<b>Figura 2.</b>	Resíduo seco de uva com tamanho de partícula média 42 mesh .....	61
<b>Figura 3.</b>	Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) da temperatura versus razão sólido:líquido da extração de antocianinas totais .....	66
<b>Figura 4.</b>	Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) da temperatura versus tempo da extração de antocianinas totais .....	66
<b>Figura 5.</b>	Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) da razão sólido:líquido versus tempo da extração de antocianinas totais .....	67
<b>Figura 6.</b>	Gráfico de probabilidade normal dos resíduos para o modelo quadrático ajustado aos teores de antocianinas totais .....	68

<b>Figura 7.</b>	Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) da temperatura versus razão sólido:líquido da extração de flavonóis totais .....	69
<b>Figura 8.</b>	Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) da temperatura versus tempo da extração de flavonóis totais .....	70
<b>Figura 9.</b>	Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) da razão sólido:líquido versus tempo da extração de flavonóis totais .....	70
<b>Figura 10.</b>	Gráfico de probabilidade normal dos resíduos para o modelo quadrático ajustado aos teores de flavonóis totais .....	71
<b>Figura 11.</b>	Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) da temperatura versus razão da extração de fenólicos totais .....	73
<b>Figura 12.</b>	Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) da temperatura versus tempo da extração de fenólicos totais .....	73
<b>Figura 13.</b>	Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) da razão sólido:líquido versus tempo da extração de fenólicos totais .....	73
<b>Figura 14.</b>	Gráfico de probabilidade normal dos resíduos para o modelo quadrático ajustado aos teores de fenólicos totais .....	74
<b>Figura 15.</b>	<i>Desirabilities</i> individuais para as variáveis independentes, respostas e global .....	75
<b>Figura 16.</b>	Gráfico de contorno da <i>desirability</i> global (D) versus as variáveis independentes .....	76
<b>Figura 17.</b>	Gráfico de contorno da otimização da extração de antocianinas totais de acordo com a <i>desirability</i> global .....	76
<b>Figura 18.</b>	Gráfico de contorno da otimização da extração de flavonóis totais de acordo com a <i>desirability</i> global .....	77
<b>Figura 19.</b>	Gráfico de contorno da otimização dos flavonóis totais de acordo com a <i>desirability</i> global .....	77
<b>Figura 20.</b>	Cinéticas da degradação de antocianinas monoméricas (A) e do incremento da cor polimérica (B) em extrato otimizado concentrado de resíduo de uva armazenado a 4°C .....	83

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Configuração das antocianidinas com maior ocorrência natural .....	23
------------------	--	----

### ARTIGO:

<b>Tabela 1.</b>	As variáveis independentes codificadas e as variáveis respostas .....	55
<b>Tabela 2.</b>	Planejamento experimental codificado Box-Behnken .....	55
<b>Tabela 3.</b>	Umidade, antocianinas totais, fenólicos totais e flavonóis totais, do resíduo de uva úmido e seco .....	61
<b>Tabela 4.</b>	Antocianinas totais, flavonóis totais e fenólicos totais, de extratos do resíduo seco, obtidos de acordo com o desenho Box-Behnken .....	63
<b>Tabela 5.</b>	Coefficientes de regressão do modelo quadrático ajustado para extração de antocianinas totais .....	65
<b>Tabela 6.</b>	Resumo do teste ANOVA do ajuste das antocianinas totais ao modelo quadrático .....	67
<b>Tabela 7.</b>	Coefficientes de regressão do modelo quadrático ajustado para extração de flavonóis totais .....	68
<b>Tabela 8.</b>	Resumo do teste ANOVA do ajuste dos flavonóis totais ao modelo quadrático .....	71
<b>Tabela 9.</b>	Coefficientes de regressão do modelo ajustado para extração dos fenólicos totais .....	72
<b>Tabela 10.</b>	Resumo do teste ANOVA do ajuste dos fenólicos totais ao modelo quadrático .....	74
<b>Tabela 11.</b>	Características físico-químicas do extrato otimizado concentrado .....	79
<b>Tabela 12.</b>	Variação do teor de antocianinas monoméricas e porcentagem da cor polimérica no extrato otimizado concentrado armazenado em temperatura de 4°C .....	81
<b>Tabela 13.</b>	Parâmetros cinéticos da degradação de antocianinas monoméricas e geração de cor polimérica do extrato otimizado concentrado em armazenamento a 4°C .....	82

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
2.1. Geral .....	14
2.2. Específicos .....	14
<b>3. PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE:.....</b>	<b>15</b>
3.1. Problema de pesquisa .....	15
3.2. Hipótese.....	15
<b>4. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
4.1. Produção de uva .....	16
4.2. A indústria de uva e seus resíduos .....	18
4.3. Compostos fenólicos da uva.....	20
4.4. Extração de antocianinas e sua estabilidade.....	25
4.5. Avaliação do processo de extração de fitoquímicos pela metodologia de superfície de respostas (MSR) .....	29
4.6. Otimização de múltiplas respostas pela função de <i>desirability</i> .....	33
4.7. Aplicação de compostos antociânicos na elaboração de alimentos .....	34
<b>5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>42</b>
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
<b>ARTIGO .....</b>	<b>49</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>49</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>50</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>52</b>
2.1. Amostra.....	52
2.2. Preparação da amostra.....	52

2.3. Reagentes .....	53
2.4. Umidade da amostra.....	53
2.5. Teor de antocianinas, flavonóis e fenólicos totais .....	53
2.6. Avaliação da extração pela Metodologia de Superfície de Resposta (MSR).....	54
2.7. Elaboração e caracterização físico-químico do extrato otimizado concentrado .....	56
2.8. Cor polimérica.....	58
2.9. Estudo da estabilidade.....	59
2.10. Análise estatística.....	59
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
3.1. Caracterização do resíduo úmido e seco .....	60
3.2. Ensaio de extração .....	63
3.3. Superfície de resposta para a extração de antocianinas totais.....	64
3.4. Superfície de resposta para a extração de flavonóis totais .....	68
3.5. Superfície de resposta para a extração de compostos fenólicos totais .....	71
3.6. Otimização da extração .....	74
3.7. Elaboração e caracterização físico-química do extrato otimizado concentrado .....	79
3.8. Estabilidade de antocianinas no extrato otimizado concentrado.....	81
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>84</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>85</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A geração de resíduos é inerente ao processo de produção, transformação e consumo de alimentos, tanto em sociedades desenvolvidas como as em desenvolvimento. Atualmente a quantidade de resíduos provindos da indústria de alimentos tem tendência crescente por efeito do crescimento demográfico, causando prejuízos econômicos e ambientais (INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS, 2010). Os investigadores Mirabella *et al.* (2014), destacam que os efeitos prejudiciais dos resíduos poderiam ser diminuídos alternativamente com o aproveitamento integral das matérias primas.

Uma das indústrias histórica e economicamente importante em muitos países do mundo é a de processamento de uvas, pois dela são obtidos diversos produtos como vinho, passas, sucos, geleias, entre outros. O fruto de uva é reconhecido pelos cientistas de alimentos por ter propriedades nutricionais e benéficas para a saúde, devido aos compostos bioativos presentes nela (FORTES; PAIS, 2016; DHEKNEY, 2016).

No Brasil a produção de uva no ano 2015 alcançou 1.492.138,00 toneladas e de acordo com o levantamento sistemático da produção agrícola de maio 2016 a produção alcançou as 955.379,00 toneladas, destacando-se três estados como os maiores produtores; Rio Grande do Sul (415.739,00 toneladas), Pernambuco (237.367,00 toneladas) e São Paulo (142.967,00 toneladas) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2016). No mundo, o Brasil ocupa a décima segunda posição na produção de uva, sendo a China Continental o líder na produção seguido pelos Estados Unidos da América, Itália, outros (FAOSTAT, 2012). As indústrias de processamento que utilizam processos mecânicos para obtenção do suco da uva e de produção de vinho geram abundante resíduo, ocasionando gastos adicionais para sua eliminação (DEVESA-REY *et al.*, 2011). Esse resíduo é comumente chamado de bagaço e é aproximadamente 30% em peso do fruto utilizado no processo, constituído por sementes, cascas e engaço (TEIXEIRA *et al.*, 2014).

Atualmente, os resíduos da industrialização de frutas, como as cascas e sementes estão sendo reconhecidos por conter fitoquímicos importantes (MORAIS *et al.*, 2015), com propriedades antioxidantes (O'SHEA *et al.*, 2012), dos quais o grupo dos compostos

fenólicos tem sido encontrado em muitas frutas tropicais (SILVA *et al.*, 2014; BATAGLION *et al.*, 2015). Assim, publicações científicas recentes destacam o resíduo de uva como potencial fonte de compostos fenólicos (GOULA *et al.*, 2016; JARA-PALACIOS *et al.*, 2015), destacando-se, do grupo dos flavonoides, as antocianinas pela sua capacidade de conferir cor e propriedades funcionais, utilizado para elaboração de alimentos funcionais (MANTELL *et al.*, 2002; VATAI *et al.*, 2008; AGUILERA *et al.*, 2016). As antocianinas responsáveis pela cor da uva foram investigadas pelos pesquisadores Ribeiro *et al.* (2015) que conseguiram identificar treze tipos de antocianinas, das quais destacaram-se a malvidina-3-O-glicosídeo, malvidina-3-O-acetilglicosídeo e malvidina-3-O-p-coumaroilglicosídeo por estar em maior concentração.

Antocianinas e outros compostos fenólicos são tradicionalmente extraídos com solventes orgânicos (acetona, metanol e etanol) acidificados com ácido clorídrico para diminuir o pH e melhorar a estabilidade das antocianinas, permitindo a extração e quantificação eficiente de antocianinas (LEES; FRANCIS, 1972; RODRIGUEZ-SAONA; WROLSTAD, 2001). A temperatura, concentração do solvente, razão sólido:líquido e tempo foram reportados como fatores que influenciaram significativamente a extração de polifenóis (PEDRO *et al.* 2016; LI *et al.* 2012)

Os solventes acidificados com ácido clorídrico são considerados tóxicos e, portanto, sua utilização na extração de antocianinas e outros polifenóis para serem utilizadas na elaboração de alimentos, torna o procedimento inseguro. Essa preocupação foi abordada por Pedro *et al.* (2016) e Li *et al.* (2012), os quais investigaram a aplicação de ácido cítrico como alternativa para melhorar a estabilidade das antocianinas visando sua utilização na elaboração de alimentos, e ambos os trabalhos mostraram, quanto a eficiência de extração, bons resultados. Assim, o uso de ácido cítrico se apresenta como uma alternativa mais segura para extração de antocianinas e compostos associados para uso em alimentos. Embora nos dois trabalhos acima mencionados, a extração tenha sido otimizada adequadamente, não foi estudada o efeito desse ácido sobre a estabilidade das antocianinas. De acordo com as considerações descritas, a presente investigação abordou os estudos da otimização de extração de polifenóis a partir de resíduo de uva proveniente da indústria de suco, a elaboração de extrato otimizado concentrado e sua estabilidade durante armazenamento.

## **2. OBJETIVOS**

### 2.1. Geral

Otimizar a extração de polifenóis do resíduo de uva proveniente da indústria de suco e avaliar sua estabilidade durante armazenamento.

### 2.2. Específicos

- Determinar as melhores condições de extração de polifenóis do resíduo de uva a traves do delineamento experimental Box-Behnken;
- Estabelecer as operações unitárias necessárias para a produção de extrato otimizado concentrado;
- Quantificar o teor de antocianinas monoméricas, fenólicos totais e flavonóis totais do extrato otimizado concentrado;
- Avaliar as características físico-químicas e cromáticas do extrato otimizado concentrado;
- Modelar a cinética de degradação de antocianinas monoméricas e de geração de cor polimérica do extrato otimizado concentrado.

### 3. PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE:

#### 3.1. Problema de pesquisa

O resíduo de uva proveniente do processamento de sucos e vinhos contém teores consideráveis de compostos bioativos, como os compostos fenólicos, flavonóis e antocianinas, os quais apresentam benefícios para a saúde, podendo ser utilizados na elaboração de alimentos funcionais. A extração de polifenóis é realizada convencionalmente utilizando etanol, metanol e acetona, acidificados com ácido clorídrico. Excetuando o etanol, todos os demais são tóxicos, portanto a inclusão em alimentos de fitoquímicos obtidos com esses solventes apresentam perigo potencial para a saúde. Visando a utilização dos polifenóis na elaboração de alimentos com propriedades funcionais, foi investigada a extração com etanol acidificado com ácido cítrico, que mostrou bons resultados em investigações recentes, mas as condições que maximizam a extração variam de um material vegetal para outro, por esse motivo é sempre necessário determinar as melhores condições de extração para cada material. Por outro lado, supõe-se que o efeito protetor do pH sobre as antocianinas e os outros compostos associados a ela é diminuído com a utilização de etanol acidificado com ácido cítrico, devido ao poder acidificante do ácido cítrico que é menor do que o ácido clorídrico, que está sendo utilizado usualmente na estabilização desse pigmento. Perante às considerações explanadas é necessário levantar as seguintes interrogantes: Qual é o efeito da temperatura, razão sólido-líquido e o tempo sobre a extração de polifenóis de resíduo de uva cv. Isabel (*Vitis labrusca*) proveniente da indústria de suco? E qual é o efeito das condições de armazenamento sobre a estabilidade do extrato otimizado concentrado?

#### 3.2. Hipótese

**H<sub>1</sub>:** As variáveis em estudo; temperatura, razão sólido-líquido e tempo influenciam significativamente sobre a extração de polifenóis do resíduo de uva proveniente da indústria de suco.

**H<sub>2</sub>:** A estabilidade das antocianinas do extrato otimizado concentrado é influenciada significativamente pelas condições de armazenamento.

## 4. REVISÃO DA LITERATURA

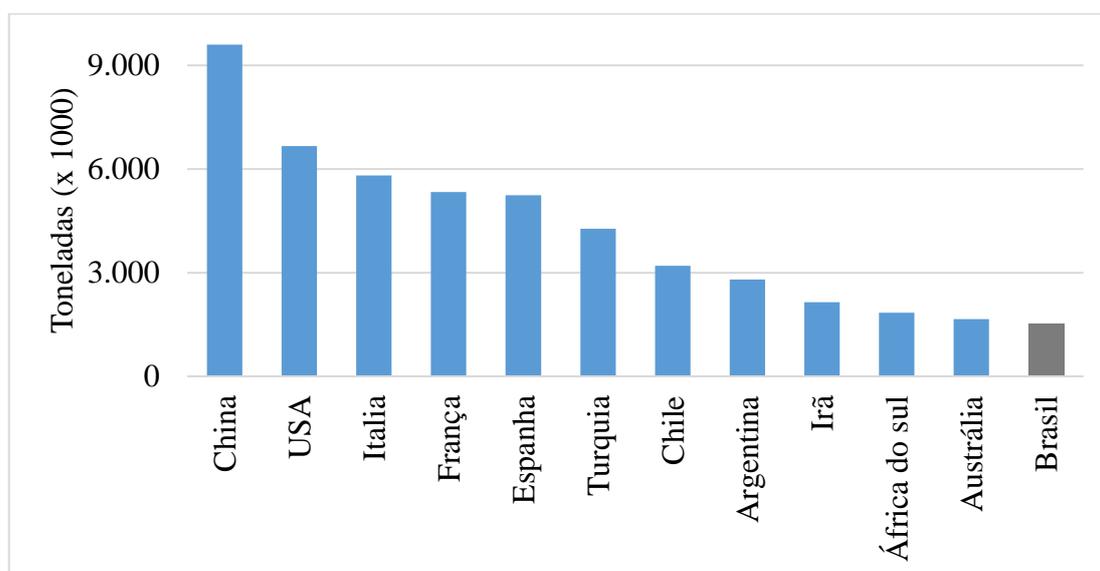
### 4.1. Produção de uva

As videiras são classificadas no gênero *Vitis*, família *Vitaceae*. O número de cultivares de videiras nomeadas atualmente é aproximadamente 15.000, das quais muitas são sinônimas. As cultivares são agrupadas de acordo com a sua origem específica ou interespecífica. A maioria das variedades comerciais são cultivares puras de *V. vinifera*. Os híbridos Franco-Americanos constituem o segundo maior grupo e, foram derivados de cruzamentos entre *V. vinifera* e um ou mais dos seguintes: *V. riparia*, *V. rupestris* e *V. aestivalis*. As cultivares americanas iniciais são seleções das vinhas indígenas, ou são híbridos entre elas e a *V. vinifera*. Por outra parte, as cultivares interespecíficas referem-se aos cruzamentos modernos entre *V. vinifera* e espécies como *V. amurensis*, *V. riparia*, *V. armata* e *V. rotundifolia* (JACKSON, 2008).

O cultivo da uva está amplamente espalhado no mundo, tendo como principal produtor a China Continental, que de acordo com estimações realizadas pela FAO tem uma produção de 9.600.000,00 toneladas. Outros países com produção considerável são os Estados Unidos de América com 6.661.820,00 toneladas, Itália com 5.819.010,00 toneladas, França com 5.338.512,00 toneladas, Espanha com 5.238.300,00, Turquia com 4.275.659,00 toneladas, Chile com 3.200.000,00 toneladas, Argentina com 2.800.000,00 toneladas e Irã com 2.150.000,00 toneladas. Os países África do Sul, Austrália, Brasil, Egito, Índia, Alemanha, Uzbequistão não alcançam dois milhões de toneladas, mas a suas produções não são inferiores a 1 milhão de toneladas, e os países como Grécia, Portugal, Romênia e Afeganistão não ultrapassam um milhão de toneladas (FAOSTAT, 2012).

A Figura 1 ilustra os nove principais países produtores de uva no mundo. Destaca-se que dentre esses se encontra dois países latino-americanos, o Chile e a Argentina com uma participação considerável que os coloca em sétimo e oitavo lugar, enquanto que o Brasil está localizado na décima segunda posição com 1.514.768,00 toneladas. A situação da participação na produção mundial de uva no Brasil pode ser explicada uma vez que concentra esforços também na produção de outros produtos agrícolas (FAOSTAT, 2012).

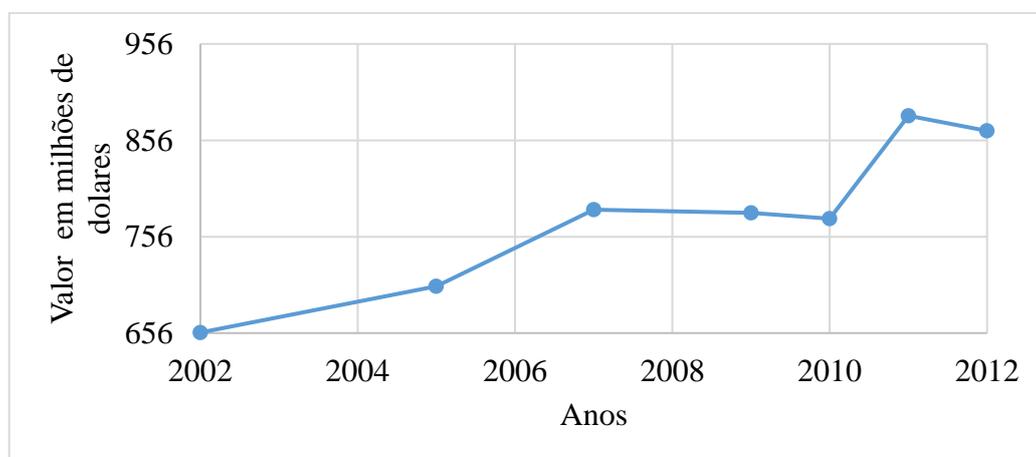
**Figura 1.** Principais países produtores de uva a nível mundial



Fonte: FAOSTAT. (2012)

Embora o volume de produção de uva no Brasil não esteja entre os vinte primeiros produtos mais produzidos, a produção nacional de uva ocupa a vigésima posição em importância econômica. O valor da produção para o ano 2012 alcançou os 865.867,00 milhões de dólares e apresenta tendência crescente de 2002 até 2012 como pode ser visualizada na Figura 2 (FAOSTAT, 2012).

**Figura 2.** Evolução do valor econômico da produção de uva no Brasil, 2002-2012



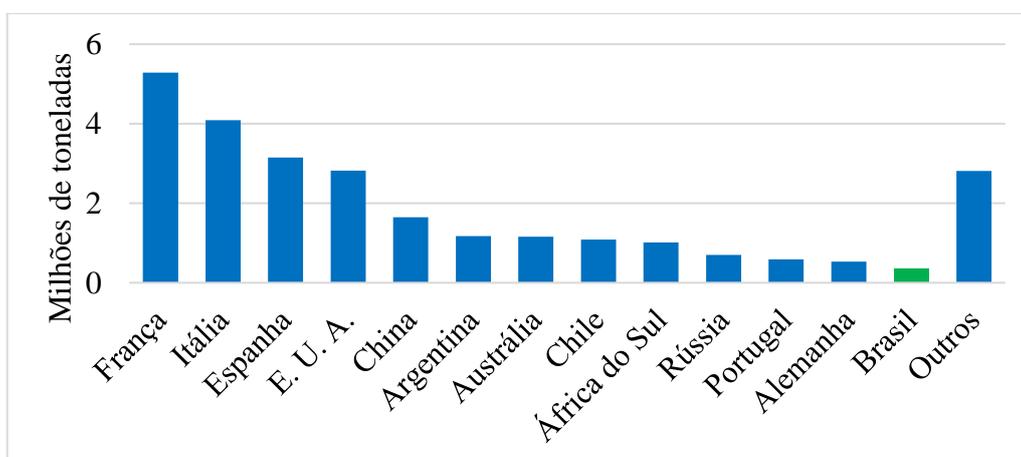
Fonte: FAOSTAT (2012)

Segundo o levantamento sistemático da produção agrícola para o mês de maio da safra 2016, a maior produção de uva está concentrada nas regiões Sul e Nordeste do Brasil, nas quais se destacam os estados de Rio Grande do Sul com 415.739,00 toneladas e Pernambuco com 237.367,00 toneladas, respectivamente (IBGE, 2016).

#### 4.2. A indústria de uva e seus resíduos

Uma das indústrias mais amplamente desenvolvidas é a indústria de vinhos, absorvendo uma importante porcentagem da produção de uva na fabricação desta bebida em muitos países do mundo. Segundo Cushman *et al.* (2007), a espécie *Vitis vinifera* é uma das mais utilizada pela indústria de vinhos e considerada como um dos cultivos mais importantes pela quantidade de produção e pelo valor econômico. Os países com as maiores produções de vinhos são a França com 5.286.414,00 toneladas, a Itália com 4.089.000,00 toneladas, a Espanha com 3.150.000,00 toneladas, os Estados Unidos de América com 2.820.000,00 toneladas e a China Continental com 1.650.000,00 toneladas. Esses dados podem ser melhor visualizados na Figura 3. Observa-se também no mesmo gráfico que o Brasil está ocupando a décima terceira posição na produção de vinho com uma produção de 350.000,00 toneladas (FAOSTAT, 2012). As estatísticas de produção de vinho, comparadas com os volumes de produção de uva mostrados na Figura 1 permitem inferir que uma importante parte do total de uvas produzidas pelo Brasil e pelos outros países é destinada à produção de vinho.

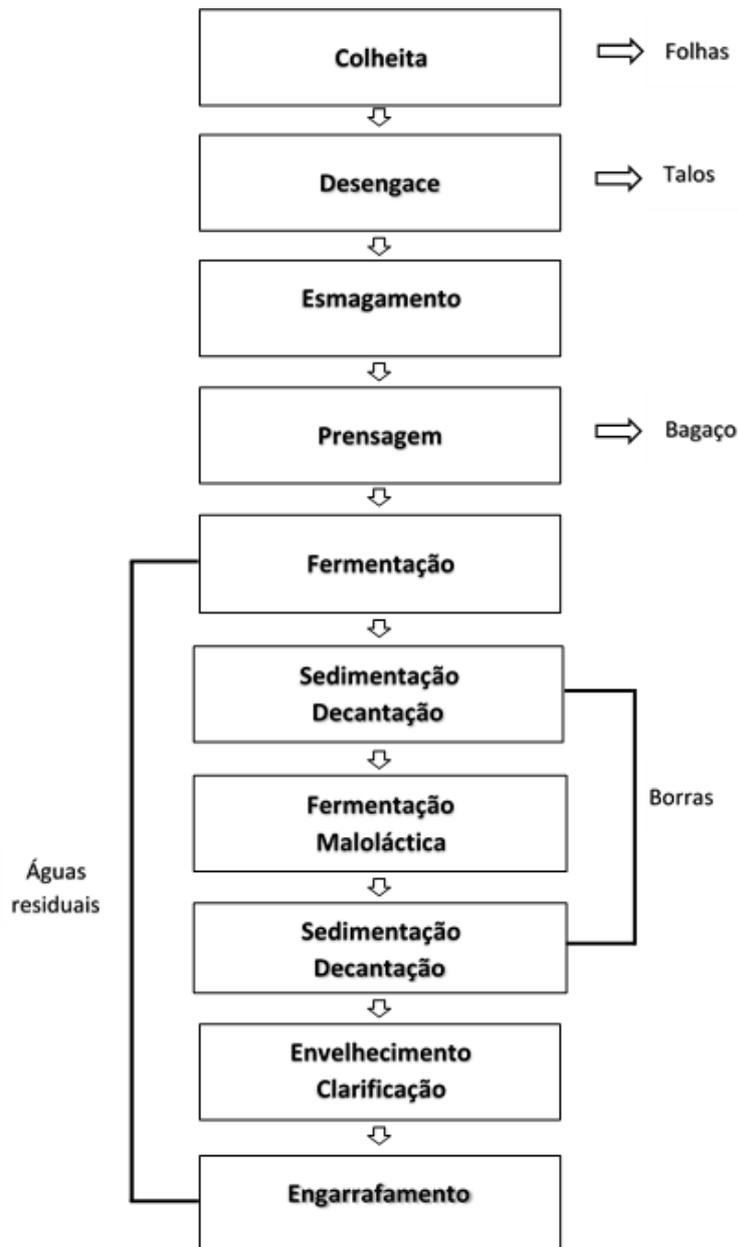
**Figura 3.** Principais países produtores de vinho



Fonte: Elaborado com dados da FAO (FAOSTAT, 2012)

Os investigadores Mateo e Maicas (2015) e Teixeira *et al.* (2014) destacam que a produção de vinho gera uma importante quantidade de resíduos industriais, como cascas, sementes e engaços, os quais representam um 30% do peso total da uva utilizada no processamento, ocasionando sérios problemas ambientais para os países produtores. Conforme a Figura 4 se destacam três operações que geram maior quantidade de resíduos orgânicos sólidos, que são colheita, desengace e prensagem.

**Figura 4.** Diagrama do processo de vinificação incluindo a geração de resíduos.



Fonte: Mateo e Maicas (2015)

A produção de suco de uva gera resíduos muito semelhantes ao da produção de vinho, mas a concentração de compostos bioativos presentes nesses resíduos pode ser diferenciado devido ao tratamento térmico utilizado na produção de sucos. Os resíduos produzidos pela indústria de vinhos, assim como na produção de suco de uva são ricos em fitoquímicos especialmente compostos fenólicos (TEIXEIRA *et al.*, 2014). O aproveitamento integral das matérias primas pode tornar as indústrias mais rentáveis e sustentáveis ambientalmente, mas a chave está na aplicação apropriada de técnicas que permitam extrair os compostos de interesse, os quais estão presentes nos subprodutos ou resíduos, podendo ser utilizados como aditivos na elaboração de novos produtos com propriedades funcionais, como alimentos ou produtos cosméticos (BARBA *et al.*, 2016).

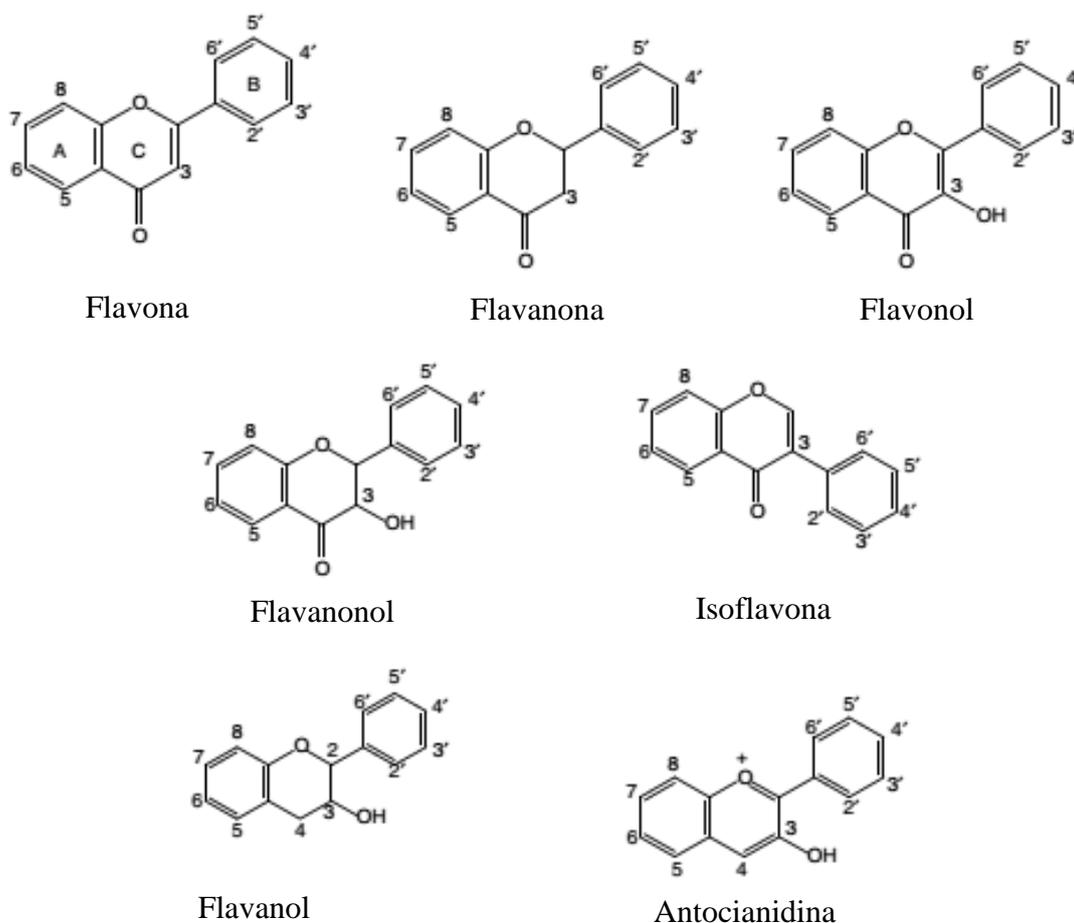
#### 4.3. Compostos fenólicos da uva

Os compostos fenólicos da uva estão distribuídos em maior diversidade e concentração na casca e nas sementes, e são responsáveis pela coloração característica do fruto e pelo desenvolvimento das características sensoriais dos produtos derivados. Lecce *et al.* (2014), avaliando o perfil fenólico da casca, polpa e sementes de uva Albariño identificaram quarenta e três compostos fenólicos. O tipo de fenólico mais abundante encontrado na baga de uva foi a forma monomérica e oligomérica do flavan-3-ols. Na casca foram detectados vinte oito compostos, dos quais os flavanóis, flavonóis e os ácidos hidroxicinâmicos, estiveram em maior concentração. Na polpa só foram detectados nove tipos de compostos fenólicos que somados totalizam  $2,98 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de amostra fresca. Na semente foram identificados vinte e sete compostos fenólicos, dos quais a (+)-Catequina e os flavanóis estiveram em maior quantidade.

Os investigadores Samoticha *et al.* (2017) identificaram 49 compostos fenólicos em uvas híbridas cultivadas na Polónia, e os classificaram em cinco grupos de compostos fenólicos: antocianinas (26), flavonóis e flavonas (9), flavan-3-óis (6), ácidos fenólicos (7) e um estilbeno (1). De forma geral, o conteúdo de compostos fenólicos variou de 1.037 a  $5.759,1 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de amostra seca das cultivares de uva investigadas e as maiores concentrações de compostos fenólicos foram observadas nas cultivares de uva vermelha.

Um subgrupo importante dos compostos fenólicos são os flavonoides. Estes compostos estão amplamente distribuídos nos tecidos vegetais e é estimado que existam pelo menos 2.000 tipos de flavonoides. Estes podem ser classificados em sete grupos; flavonas, flavononas, flavonolóis, isoflavonas, flavanóis (catequinas) e antocianinas. Cada um destes grupos apresenta uma estrutura básica que o identifica, as quais podem ser visualizadas na Figura 5. Entre as características biológicas e químicas dos flavonoides destaca-se a atividade antioxidante, como, a capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio, a capacidade de sequestrar eletrófilos, a capacidade de inibir a nitrosação, a capacidade de quelar metais, o potencial para produzir peróxido de hidrogênio na presença de alguns metais e a capacidade de modular a atividade de algumas enzimas celulares (FENNEMA *et al.*, 2010).

**Figura 5.** Estrutura do esqueleto carbônico de alguns flavonoides mais frequentes



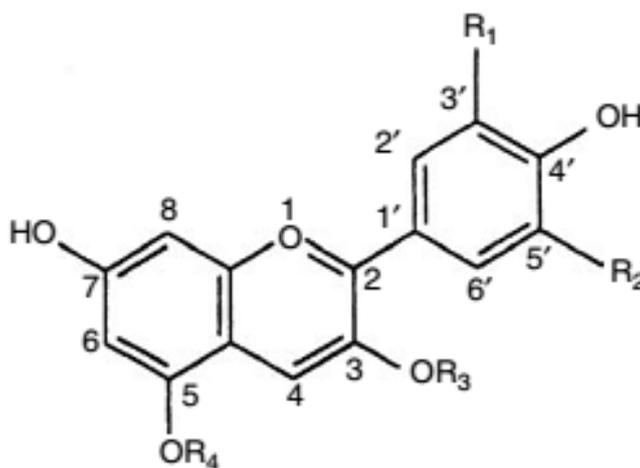
Fonte: Fennema *et al.* (2010)

O grupo das antocianinas diferencia-se dos outros grupos de flavonoides pela propriedade de conferir cores diversas nas plantas, como azul, roxo, violeta, magenta, vermelho e laranja. O nome deste pigmento deriva de duas palavras gregas *anthos* (flores) e *kyanos* (azul), e estes compostos foram amplamente estudadas por dois pesquisadores notáveis Sir Robert Robinson (1886-1975) e o professor Richard Willstätter (1872-1942) os quais foram reconhecidos com o Prêmio Nobel em química pelos seus trabalhos em pigmentos naturais (FENNEMA *et al.*, 2010).

O esqueleto carbônico  $C_6C_3C_6$  é a característica em comum dos flavonoides e que os diferencia de outros compostos fenólicos. A partir desse esqueleto químico é formado o cátion 2-fenilbenzopirona ou também chamado de cátion *flavylium*, que é a estrutura básica das antocianidinas, onde os grupamentos  $R_{(1, 2, 3 \text{ e } 4)}$ , podem ser substituídos (Figura 6).

A substituição dos grupos  $R_1$  e  $R_2$  por grupos hidroxí (-OH), metoxi (-OCH<sub>3</sub>) ou hidrogênio (-H) vão dar origem às antocianidinas. Foram relatados 23 tipos de antocianidinas, no entanto, apenas seis são encontradas frequentemente nos alimentos vegetais. A configuração destas antocianidinas é mostrada na Tabela 1 (CLIFFORD, 2000; ZHANG *et al.*, 2005; FENNEMA *et al.*, 2010).

**Figura 6.** Estrutura do cátion 2-fenilbenzopirona



Fonte: Zhang *et al.* (2005)

**Tabela 1.** Configuração das antocianidinas com maior ocorrência natural

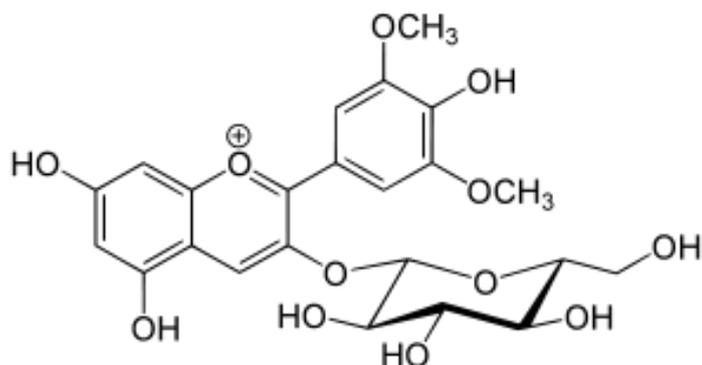
Antocianidinas	Grupo R <sub>1</sub>	Grupo R <sub>2</sub>
Pelargonidina (Pg)	H	H
Cianidina (Cy)	OH	H
Delfinidina (Dp)	OH	OH
Malvidina (Mv)	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Peonidina (Pn)	OCH <sub>3</sub>	H
Petunidina (Pt)	OCH <sub>3</sub>	OH

Fonte: Zhang *et al.* (2005)

Por outro lado, os grupos R<sub>(3 e 4)</sub> podem ser substituídos por monossacarídeos, dissacarídeos ou trissacarídeos, podendo ser os dois últimos tipos, homogêneos ou heterogêneos. Os açúcares mais comuns são a glicose, ramnose, galactose, arabinose e xilose. A substituição nas posições R<sub>(3 e 4)</sub>, por uma molécula de sacarídeo dará origem a uma antocianina que pode ser considerada a sua mais simples configuração. Essa configuração pode-se tornar mais complexa pela acilação desses açúcares, tendo sido reportadas mais de 635 antocianinas (HE; GIUSTI, 2010). Os ácidos mais frequentes que participam na acilação dos açúcares são os ácidos aromáticos, como o *p*-cumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico, ou ácidos *p*-hidroxibenzóico e/ou alifáticos, como o ácido malônico, acético, málico, succínico ou oxálico (FENNEMA *et al.*, 2010).

Em um estudo realizado por Ribeiro *et al.*, (2015), foram identificadas as antocianidinas: delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina, no bagaço de uva (*Vitis labrusca*) derivado do processo de vinificação. As cinco antocianidinas identificadas estiveram constituindo treze tipos de antocianinas, das quais, a malvidina 3-*O*-glicosídico, a Malvidina 3-*O*-acetil glicosídico e a malvidina 3-*O*-*p*-coumaroil glicosídico foram encontrados em maior concentração. Na Figura 7 verifica-se a estrutura de uma das antocianinas identificadas.

**Figura 7.** Estrutura da Malvidina 3-*O*-glucosídeo



Fonte: Ribeiro *et al.* (2015)

As antocianinas têm chamado a atenção de muitos cientistas, pela capacidade de conferir cor e pelos benefícios potenciais para a saúde. O potencial efeito benéfico para a saúde derivado do consumo de antocianinas têm sido motivo de muitas pesquisas *in vitro*, em animais e em seres humanos, que evidenciam que as antocianinas possuem poder anti-inflamatório, anti-carcinogênico, podem prevenir doenças cardiovasculares, obesidade e propriedades para mitigar a diabetes. Essas propriedades são atribuídas a sua elevada capacidade antioxidante (FANG, 2015; HE; GIUSTI, 2010).

As evidências dos benefícios potenciais para a saúde e com base nos estudos de avaliação toxicológica das antocianinas efetuados em ratos permitiu concluir aos experts da FAO/OMS do comitê de aditivos alimentares (ECAA) que o uso de antocianinas de origem natural representa um risco de toxicidade muito baixa (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1982). Por outro lado, há uma constante preocupação pelo consumo de alimentos produzidos com aditivos sintéticos, pela possibilidade de produzirem efeitos negativos na saúde. Um grande grupo destes aditivos são os corantes sintéticos, que são utilizados amplamente em uma diversidade de alimentos consumidos atualmente. Essa preocupação motiva as investigações sobre aplicação de corantes de fontes naturais para elaboração de alimentos, como sucos, iogurtes, frutos desidratados osmoticamente enriquecidos com antocianinas, entre outros produtos (GIUSTI; WROLSTAD, 2003; ADSARE *et al.*, 2016; NONTASAN *et al.*, 2012).

#### 4.4. Extração de antocianinas e sua estabilidade

A extração sólido-líquido de antocianinas está fundamentada na teoria da difusividade, na qual indica que a extração é governada pelo fenômeno de transferência de massa, por efeito do gradiente de concentração do composto de interesse. O processo de extração começa quando o solvente é absorvido pela matriz que contém o pigmento a ser extraído, produzindo a diluição do pigmento, que a seguir será difundido do interior para a superfície da matriz que a contém (VARZAKAS *et al.*, 2005). A difusividade das antocianinas é influenciada pela viscosidade do solvente, temperatura, tamanho de partícula, proporção de solvente, pH da solução, tempo de extração, taxa de fluxo ou agitação, concentração do solvente (MANTELL *et al.*, 2002; CISSÉ *et al.*, 2012).

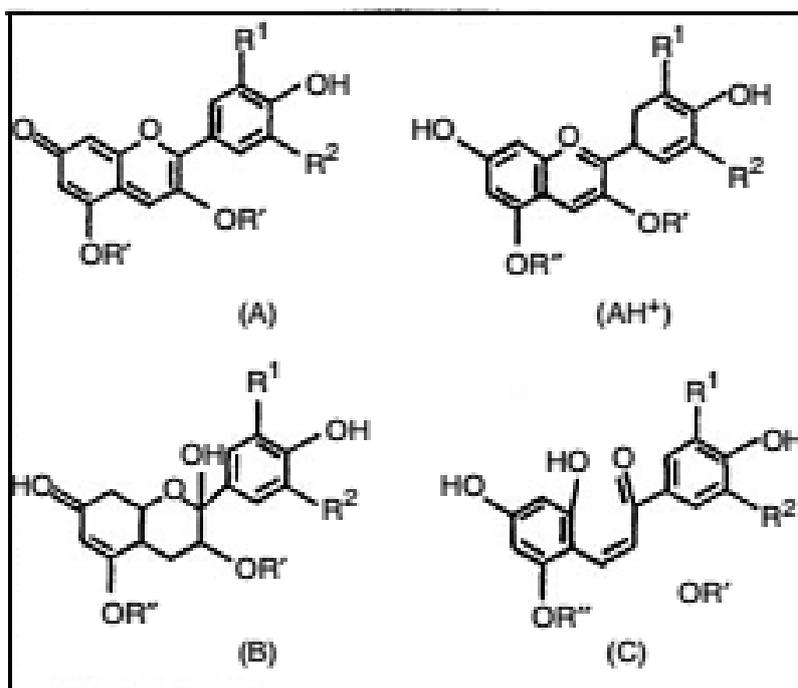
A extração de compostos antociânicos é conduzido usualmente utilizando diversos solventes tais como água (CISSÉ *et al.*, 2012), etanol (NOUR *et al.*, 2013), metanol (MANTELL *et al.*, 2002), acetona (RODRIGUEZ-SAONA e WROLSTAD, 2001) que em geral são acidificados com ácido clorídrico para evitar a degradação da antocianina no processo de extração. Por outro lado, investigações recentes estão sendo efetuadas para substituir o uso dos solventes tóxicos e o ácido clorídrico como agentes de extração de antocianinas. Assim, estudos mostram resultados promissores com o uso de etanol ou água, acidificada com ácido cítrico ou ácido acético, os quais foram usados para extração de polifenóis em arroz preto (PEDRO *et al.*, 2016), cálices de flores de *Hibiscus sabdariffa* (CISSÉ *et al.*, 2012), casca de uva (LI *et al.*, 2012), batata roxa (HEINONEN *et al.*, 2016) e arroz preto roxo (PEREIRA-CARO *et al.*, 2013).

As antocianinas são muito instáveis tanto isoladas como dentro dos tecidos vegetais e sua instabilidade é devido basicamente à conformação da sua estrutura química. Portanto, é possível que haja sua degradação no processo de extração, transformação e armazenamento dos alimentos ricos nesses pigmentos. Além disso, a susceptibilidade à degradação é influenciada por vários fatores, como pH, temperatura, concentração de oxigênio, entre outros (FENNEMA *et al.*, 2010).

O pH da solução causa efeito sobre a estabilidade da antocianina produzindo transformações na estrutura da molécula. Na Figura 8, pode-se observar as quatro formas

estruturais da antocianina produzida pela variação do pH, a base quinonoidal de coloração azul (A), cátion flavylium de cor vermelha (AH<sup>+</sup>), pseudobase carbinol incolor (B) e chalcona incolor (C) (FENNEMA *et al.*, 2010). Em solução aquosa, as duas últimas formas estruturais da antocianina são originadas quando o pH tende para a neutralidade. O surgimento dessas duas formas marca o início da degradação do pigmento, visualmente percebido pelo clareamento ou perda de cor.

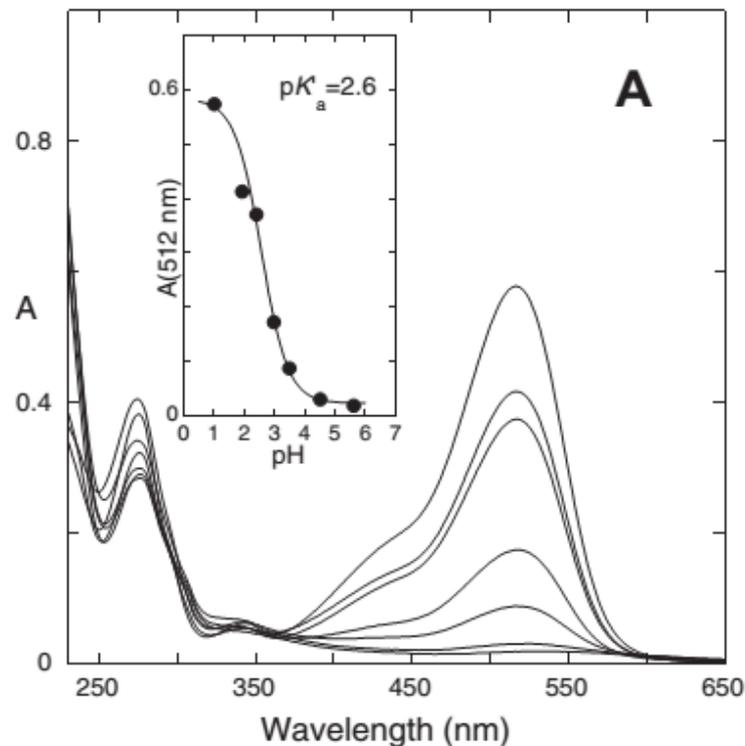
**Figura 8.** Formas estruturais da antocianina devido ao pH



Fonte: Fennema *et al.* (2010)

A influência do pH sobre a estrutura de moléculas de antocianinas pode ser melhor explicada pela variação do espectro de absorção. Num experimento foi utilizada sete soluções de delfinidina-3-glicosídeo a uma concentração de  $2,0 \times 10^{-5}$  M, com o pH variando de 1,0 até 5,6. O espectro de absorção, determinado para cada uma das soluções, pode ser visualizado na Figura 9. A absorção, à medida que o pH se aproxima de 5,6, indica a transformação do cátion *flavylium* em espécies incoloras como a chalcona e a pseudobase carbinol, as quais são incapazes de absorver luz no comprimento de onda ( $\lambda_{\max}$ ) das antocianinas (LEYDET *et al.*, 2012).

**Figura 9.** Espectros de absorção de delphinidina-3-glicosídeo em diferentes pH (1,0 – 5,6)



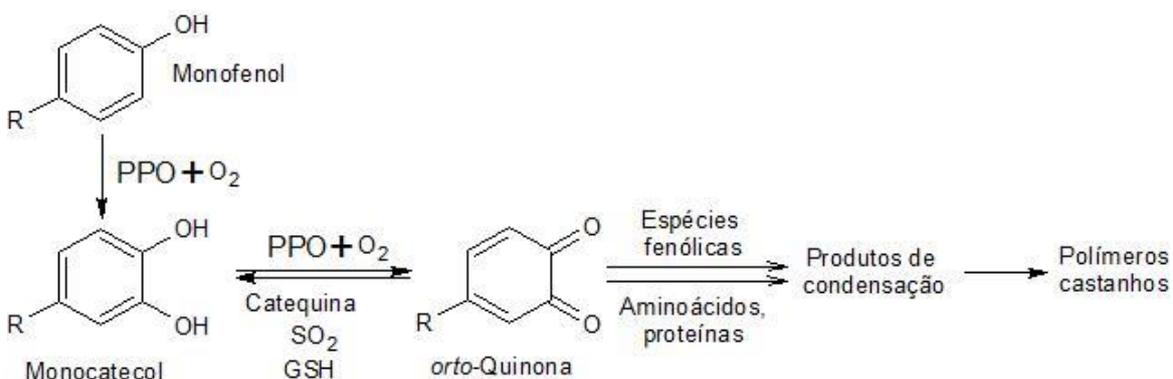
Fonte: Leydet *et al.* (2012)

A temperatura é um dos mais importantes fatores que influenciam na estabilidade de antocianinas nos alimentos. A aplicação de altas temperaturas no processamento é frequente e necessária para reduzir carga microbiana e aumentar a digestibilidade dos alimentos. No estudo realizado pelos investigadores Sinela *et al.* (2017), em extratos de *Hibiscus sabdariffa* armazenados a diferentes temperaturas (4 – 37°C) por um período de sessenta dias, as antocianinas degradaram seguindo uma cinética de primeira ordem. O efeito combinado de pH e temperatura sobre a estabilidade de cianidina-3-glicosídeo em solução aquosa foram avaliadas por Sui *et al.* (2014). Esses autores relataram que a diminuição do pH desempenhou um efeito protetor nos tratamentos térmicos. No entanto, quando compararam os efeitos degradantes entre a temperatura e pH, o aumento de temperatura teve um maior impacto na degradação de antocianinas do que o aumento de pH.

Um outro fator é o oxigênio molecular; essa espécie de oxigênio afeta a estabilidade das antocianinas produzindo sua degradação, devido à natureza da estrutura insaturada do

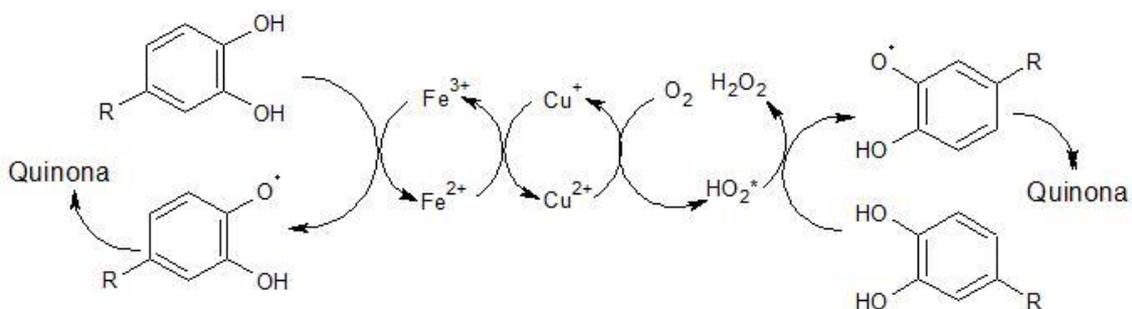
pigmento. No entanto a degradação por efeito do oxigênio não é direta e foram descritos dois processos ou vias pelas quais o oxigênio degrada as antocianinas. A primeira é pela oxidação enzimática de compostos fenólicos pelas enzimas polifenoloxidase ou peroxidase em presença de oxigênio, produzindo produtos altamente reativos, como as quinonas, que provavelmente reagem com as antocianinas e formam produtos marrons. A segunda é a oxidação não enzimática, na qual ocorrem processos de oxidação de polifenóis e os produtos dessas reações de oxidação são quinonas e peróxido de hidrogênio, ambos com potencial para degradar antocianinas (OLIVEIRA *et al.*, 2011; HÉRITIER *et al.*, 2016). As duas vias para a degradação de antocianinas são mostradas nas Figura 10 e 11, respectivamente.

**Figura 10.** Processo de escurecimento enzimático em mostos de vinhos



Fonte: Li *et al.* (2008)

**Figura 11.** Ação catalítica proposta de íons de ferro e de cobre na oxidação de catecóis para produzir quinonas e peróxido de hidrogênio.



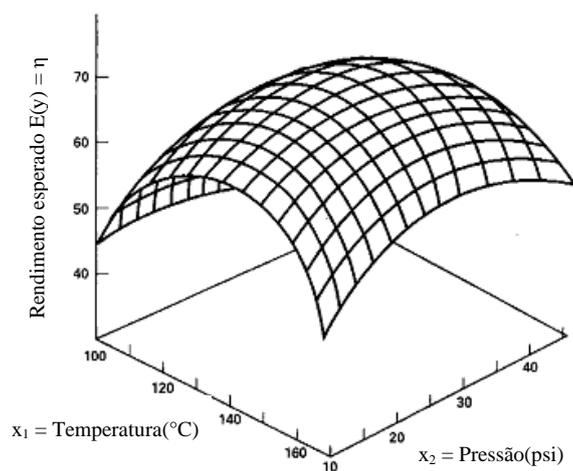
Fonte: Danilewicz *et al.* (2008)

A fotodegradação das antocianinas é bem conhecida em sucos de frutas e vinhos, não obstante se tenha reportado que as antocianinas metiladas e aciladas são mais estáveis quando expostas a luz. Foi relatado também que antocianinas diaciladas com ácidos aromáticos apresentam sensibilidade a fotodegradação na faixa de pH de 3 até 7 (DYRBY *et al.*, 2001). Por outro lado, concentrações elevadas de açúcares ajudam na conservação de antocianinas, como por exemplo, em produtos de conserva. Essa proteção é explicada pela baixa atividade de água, evitando o ataque nucleofílico da água sobre a posição C-2 do cátion *flavylium* e a consequente transformação em compostos incolores (FENNEMA *et al.*, 2010).

#### 4.5. Avaliação do processo de extração de fitoquímicos pela metodologia de superfície de respostas (MSR)

A metodologia de superfície de respostas (MSR) é uma coleção de técnicas matemáticas e estatísticas úteis na modelagem e análises de operações, nas quais uma resposta de interesse recebe a influência de diversas variáveis e onde o objetivo é otimizar a resposta ou as respostas. A superfície de resposta é representada graficamente como apresentado na Figura 12, onde  $\eta$  é plotada contra os níveis das variáveis  $x_1$  e  $x_2$  (MONTGOMERY, 2013).

**Figura 12.** Superfície de resposta tridimensional

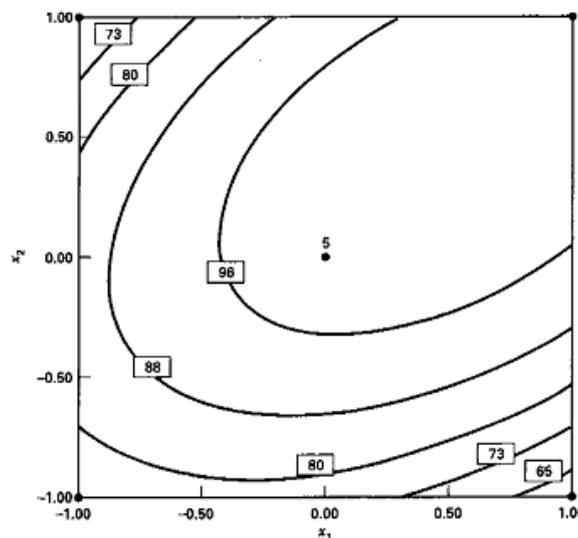


Fonte: Montgomery (2013)

O conhecimento do processo a ser avaliado pela MSR é muito importante, para determinar os níveis das variáveis independentes e o modelo matemático a utilizar para ajustar aos dados experimentais, o que permitirá entender melhor a relação entre as variáveis. Dependendo da relação entre as variáveis, podem ser utilizados modelos de primeira ordem, segunda ordem ou superior. Um aspecto importante da otimização de operações pela MSR é a coleta dos dados experimentais que devem ser conduzidos por desenhos experimentais apropriados o que permitirá estimar os parâmetros do modelo de maneira mais eficiente. O objetivo final da MSR é determinar condições de operações ótimas, na qual as intensidades das variáveis independentes satisfaçam os requerimentos da operação (MONTGOMERY, 2013).

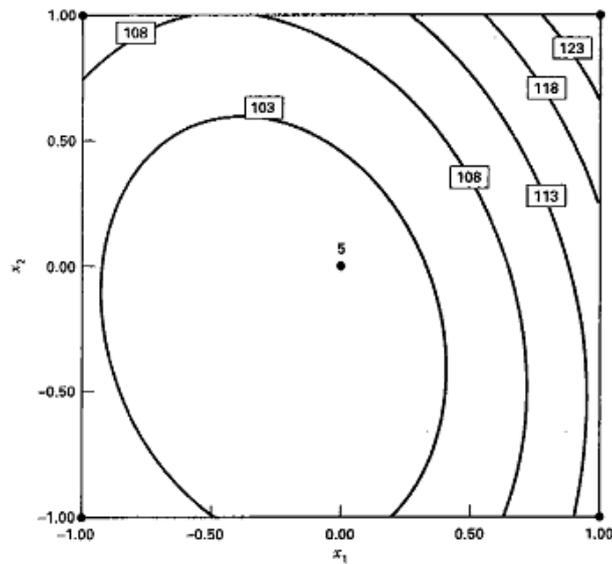
Em modelos de segunda ordem, a análise da superfície de resposta (SR) para encontrar o conjunto ótimo de condições de operação e caracterizar a natureza da superfície de resposta, é realizada determinando o ponto estacionário. Este ponto, em caso de existir, será constituído pelas coordenadas obtidas a partir das derivadas parciais da função de cada variável independente. A caracterização da SR consiste em determinar se o ponto estacionário é um ponto máximo (Figura 13), mínimo (Figura 14) ou ponto cadeira (Figura 15). Por outra parte, os gráficos de contorno do modelo ajustado são muito úteis na hora de realizar a caracterização da SR, permitindo determinar diretamente a sensibilidade da variável resposta às variáveis independentes (MONTGOMERY, 2013).

**Figura 13.** Gráfico de contorno do ponto estacionário máximo



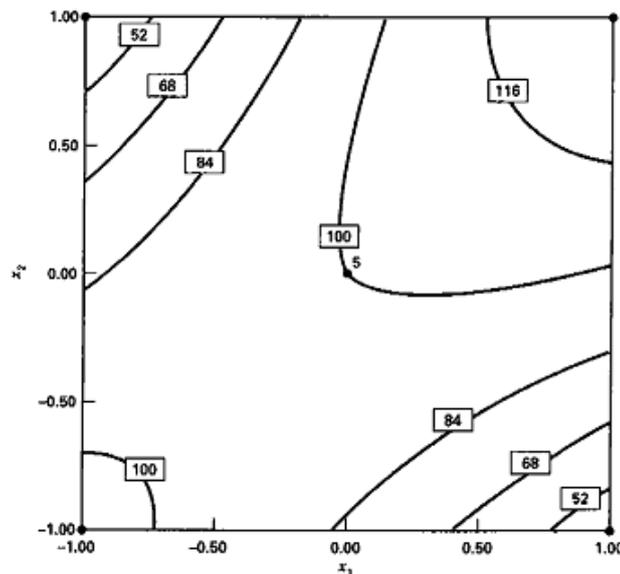
Fonte: Montgomery (2013)

**Figura 14.** Gráfico de contorno ponto estacionário mínimo



Fonte: Montgomery (2013)

**Figura 15.** Gráfico de contorno do ponto estacionário de cadeira



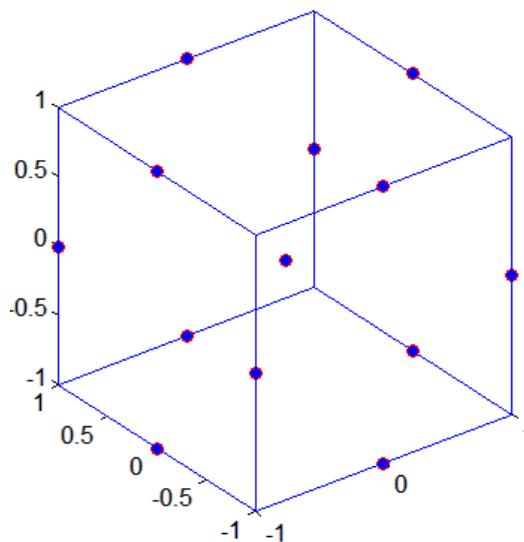
Fonte: Montgomery (2013)

A eleição do desenho experimental facilita o ajuste e análise da SR. Algumas das características desejáveis no desenho escolhido são proporcionar distribuição razoável dos pontos dos dados na região de interesse, permitir investigar a adequação do modelo (teste de falta de ajuste), permitir que os experimentos se realizem em blocos, permitir estimar o erro interno, permitir estimar com precisão os parâmetros do modelo, ajudar a reduzir o

número de ensaios requeridos, entre outros. Um dos desenhos utilizados para ajustar o modelo de segundo ordem, é o Desenho de Box-Behnken (DBB). Os DBB são construídos combinando fatoriais do tipo  $2^k$  com desenhos de blocos incompletos. Os desenhos resultantes são considerados muito eficientes pelo número de ensaios necessários e são rotativos ou quase rotativos (MONTGOMERY, 2013).

O planejamento experimental Box-Behnken para três variáveis é ilustrado de forma geométrica na Figura 16. A característica particular do desenho é a ausência de pontos nos vértices da região cúbica criada pelos limites de cada variável, o que é vantajoso porque os pontos dos vértices geralmente são ensaios custosos ou em alguns casos impossíveis devido a restrições físicas à operação.

**Figura 16.** Desenho Box-Behnken para três variáveis



Segundo Granato *et al.* (2014) os dados experimentais obtidos através dos ensaios realizados de acordo com o desenho experimental para ser analisados pela MSR devem ser avaliados previamente para determinar se seguem a distribuição normal e se são homocedásticos, requisitos fundamentais para análise pela MSR (GRANATO *et al.*, 2014). Quando os dados experimentais não seguem a distribuição normal, alternativamente recomenda-se utilizar técnicas de transformação para normalizar os dados, como descrito pelos os investigadores Box e Cox (1964).

#### 4.6. Otimização de múltiplas respostas pela função de *desirability*

Na otimização de operações e/ou processos na indústria, um problema frequente é a otimização de múltiplas respostas simultaneamente, isto é possível utilizando a função de *desirability*, metodologia desenvolvida pelos investigadores Derringer e Suich (1980). Esse método atribui uma pontuação a um conjunto de respostas e escolhe configurações de fatores que maximizam a pontuação. A abordagem matemática da função de *desirability*, pode ser explicada supondo-se que cada uma das  $k$  variáveis de resposta está relacionada às  $p$  variáveis independentes pela seguinte equação.

$$y_{ij} = f_i(x_1, \dots, x_p) + \varepsilon_{ij}, \quad i = 1, \dots, k, \quad j = 1, \dots, n_i, \quad (\text{Equação 1})$$

Onde,  $y_{ij}$ , é a  $j$ -ésima observação sobre a  $i$ -ésima resposta e  $f_i$  denota a relação entre a  $i$ -ésima resposta,  $y_i$ , e  $x_1, \dots, x_p$ . O parâmetro  $n_i$ , é o número máximo de observações para cada uma das  $k$  respostas e  $\varepsilon_{ij}$ , é um termo de erro com média  $E(\varepsilon_{ij}) = 0$  e variância  $VAR(\varepsilon_{ij}) = \sigma_i^2$ , dessa forma se pode relacionar a resposta média às  $p$  variáveis independentes como mostra a equação seguinte.

$$\eta_i = f_i(x_1, \dots, x_p) \quad i = 1, \dots, k. \quad (\text{Equação 2})$$

A função de *desirability*,  $d_i(y_i)$ , atribui valores entre 0 e 1 para cada resposta. O valor de  $d_i(y_i)$  aumenta quando o valor da resposta se aproxima ao desejável. A partir dos valores de  $d_i(y_i)$  para cada uma das variáveis respostas é calculado a *desirability* global,  $D$ , pela média geométrica, de acordo com a equação:

$$D = (d_1(y_1) * d_2(y_2) * \dots * d_k(y_k))^{1/k} \quad (\text{Equação 3})$$

Há dois tipos de transformações, unilateral e bilateral. A primeira é utilizada quando o objetivo é maximizar ou minimizar a variável resposta, o que pode ser obtido pela Equação 4. A segunda, quando se atribui um valor alvo para a resposta, pode ser obtido com a Equação 5. Onde,  $y_{i*}$  e  $y_i^*$ , são os valores mínimo e máximo aceitável para  $\hat{y}_i$ . E  $c_i$ ,

é o valor alvo assignado para  $\hat{y}_i$ . Os valores de  $r$ ,  $s$  e  $t$  usados nas transformações são definidas arbitrariamente.

$$d_i(y_i) = \begin{cases} 0 & \hat{y}_i \leq y_{i*} \\ \left[ \frac{\hat{y}_i - y_{i*}}{y_i^* - y_{i*}} \right]^r & y_{i*} < \hat{y}_i < y_i^* \\ 1 & \hat{y}_i \geq y_i^* \end{cases} \quad (\text{Equação 4})$$

$$d_i = \begin{cases} \left[ \frac{\hat{y}_i - y_{i*}}{c_i - y_{i*}} \right]^s & y_{i*} \leq \hat{y}_i \leq c_i \\ \left[ \frac{\hat{y}_i - y_i^*}{c_i - y_i^*} \right]^t & c_i < \hat{y}_i \leq y_i^* \\ 0 & \hat{y}_i < y_{i*} \text{ ou } \hat{y}_i > y_i^* \end{cases} \quad (\text{Equação 5})$$

#### 4.7. Aplicação de compostos antociânicos na elaboração de alimentos

A demanda por alimentos saudáveis e de origem natural tem aumentado por causa da consciência dos benefícios positivos para à saúde. Esse fato tem motivado investigações sobre a valorização de materiais vegetais ricos em fitoquímicos bioativos, sua identificação, nos métodos de extração, estabilização e aplicação na elaboração de alimentos funcionais. Fontes vegetais de antocianinas incluem, rabanetes, batatas vermelhas, repolho vermelho, cenoura preta e batata-doce roxa. Extratos de rabanete e batata doce foram utilizados na elaboração de sucos, apresentando cor vermelha brilhante e estável (GIUSTI e WROLSTAD, 2003)

Nontasam *et al.* (2012), utilizando o farelo de arroz preto como fonte de polifenóis, obtiveram um corante em pó com o objetivo de aplicá-lo na elaboração de iogurte e constataram a presença de compostos fenólicos, como o  $\gamma$ -orizanol e as antocianinas. Em outro trabalho foi investigado, por tratamento osmótico, a impregnação de antocianinas obtidas do fruto de kokam (*Garcinia indica*) em frutos de groselha indiana (*Emblica officinalis*). Os resultados indicaram que o tratamento osmótico é uma tecnologia viável para impregnação de compostos bioativos em alimentos sólidos (ADSARE *et al.*, 2016). Os investigadores Chung *et al.* (2017) aplicaram antocianinas extraídas de cenoura roxa na elaboração de bebidas modelos não alcoólicas adicionadas de aminoácidos, observaram

que a adição de aminoácidos pode melhorar a estabilidade da cor de antocianinas em bebidas modelos.

A aplicação de compostos antociânicos em alimentos apresenta várias limitações, dentre elas se destaca sua baixa estabilidade frente a fatores como pH e temperatura, bem como a metodologia empregada para sua extração. Atualmente há um grande desafio na Ciência e Tecnologia de Alimentos, que é a extração de fenólicos a partir de solventes não tóxicos. Diante destas constatações, houve motivação para o desenvolvimento desta pesquisa.

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ADSARE S. R; BELLARY A. N; SOWBHAGYA H. B; BASKARAN R; PRAKASH M; RASTOGI N. K. Osmotic treatment for the impregnation of anthocyanin in candies from Indian gooseberry (*Emblica officinalis*). **Journal of Food Engineering**, v.175, p.24-32, 2016.

AGUILERA Y; MOJICA L; REBOLLO-HERNANZ M; BERHOW M; MEJÍA E. G; MARTÍN-CABREJAS M. A. Black bean coats: New source of anthocyanins stabilized by b-cyclodextrin copigmentation in a sport beverage. **Food Chemistry**, v.212, p.561–570, 2016.

BATAGLION G. A.; SILVA F. M. A.; EBERLIN M. N.; KOOLEN H. H. F. Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v.180, p.280-287, 2015.

BARBA F. J; ZHU Z; KOUBAA M; SANT'ANA A. S; ORLIEN V. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v.49, p.96-109, 2016.

BOX G. E. P; COX D. R. An Analysis of Transformations. **Journal of the Royal Statistical Society**. v.26, p.211-252, 1964.

CISSÉ M; BOHUON P; SAMBE F; KANE C; SAKHO M; DORNIER M. Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*: Experimental kinetics and modeling. **Journal of Food Engineering**, v.109, p.16–21, 2012.

CLIFFORD M. N. Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.1063–1072, 2000.

CHUNG C; ROJANASASITHARA T; MUTILANGI W; McCLEMENTS D. J. Stability improvement of natural food colors: Impact of amino acid and peptide addition on anthocyanin stability in model beverages. **Food Chemistry**, v.218, p.277-284, 2017.

DEVESA-REY R; VECINO X; VARELA-ALENDE J. L; BARRAL M. T; CRUZ J. M; MOLDES A. B. Country Report: Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. **Waste Management**, v.31, p.2327–2335, 2011.

DHEKNEY S. A. Grape. In: CABALLERO B; FINGLAS P. M; TOLDRÁ F. Encyclopedia of Food and Health. London: Academic Press, 1<sup>st</sup> Edition, 2016, p.261-265, doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00360-3.

DANILEWICZ J.C; SECCOMBE J.T; WHELAN J. Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.59, p.128–136, 2008.

DYRBY M; WESTERGAARD N; STAPELFELDT H. Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. **Food Chemistry**, v.72, p.431-437, 2001.

DERRINGER G; SUICH R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v.12, p.214-219, 1980.

FANG J. Classification of fruits based on anthocyanin types and relevance to their health effects. **Nutrition**, v.31, p.1301-1306, 2015.

FORTES A. M; PAIS M. S. Grape (*Vitis species*). In: SIMMONDS M; PREEDY V. Nutritional Composition of Fruit Cultivars. London: Academic Press, 1<sup>st</sup> Edition, 2016, cap.12, p.257-286. doi:10.1016/B978-0-12-408117-8.00012-X.

FENNEMA O.; PARKIN K.; DAMODARAN S. **Química de alimentos**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

FAO. FAOSTAT: Food and Agricultural commodities production. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=en>>. Acesso em: 10 jul. 2016.

GOULA A. M; THYMIATIS K; KADERIDES K. Valorization of grape pomace: Drying behavior and ultrasound extraction of phenolics. **Food and Bioproducts Processing**, Available in: [doi:10.1016/j.fbp.2016.06.016](https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.06.016), 2016.

GRANATO D; CALADO V. M. A; JARVIS B. Review: Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology. **Food Research International**, v.55, p.137–149, 2014.

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

JACKSON R. S. **Wine Science: Principles and applications**. 3th Edition. Canada: Academic Press, 2008. p.789.

GRIMPLET J; DELUC L. G; CRAMER G. R; CUSHMAN J. C. Integrating functional genomics with salinity and water deficit stress responses in wine grape - *Vitis vinifera*. In: JENKS M. A; HASEGAWA P. M; JAIN S. M. (Eds.). **Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops**, Netherlands: Springer, 2007, p.643–668.

HE J; GIUSTI M. M. Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.1, p.163-187, 2010.

INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. Feeding the World Today and Tomorrow: The Importance of Food Science and Technology. An IFT Scientific Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.0, p.1-28, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento das Safras Agrícolas no Ano Civil, maio 2016. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default\\_publico\\_completa.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default_publico_completa.shtm). Acesso em: 10 jul. 2016.

JARA-PALACIOS M. J; HERNANZ D; CIFUENTES-GOMEZ T.; ESCUDERO-GILETE M. L.; HEREDIA F. J; SPENCER J. P. E. Assessment of white grape pomace from winemaking as source of bioactive compounds, and its antiproliferative activity. **Food Chemistry**, v.183, p.78-82, 2015.

JAFARI S; MAHDAVI-KHAZAEI K; HEMMATI-KAKHKI A. Microencapsulation of saffron petal anthocyanins with cress seed gum compared with Arabic gum through freeze drying. **Carbohydrate Polymers**, v.140, p.20-25, 2016.

LECCE G; ARRANZ S; JÁUREGUI O; TRESSERRA-RIMBAU A; QUIFER-RADA P; LAMUELA-RAVENTÓS R. M. Phenolic profiling of the skin, pulp and seeds of Albariño grapes using hybrid quadrupole time-of-flight and triple-quadrupole mass spectrometry. **Food Chemistry**, v.145, p.874–882, 2014.

LEYDET Y; GAVARA R; PETROV V; DINIZ A. M; PAROLA A. J; LIMA J. C; PINA F. The effect of self-aggregation on the determination of the kinetic and thermodynamic constants of the network of chemical reactions in 3-glucoside anthocyanins. **Phytochemistry**, v.83, p.125-135, 2012.

LEES D. H; FRANCIS F. J. Standardization of pigment analyses in cranberries. **HortScience**, v.7, p.83-84, 1972.

LI Y; HAN L; MA R; XU X; ZHAO C; WANG Z; CHEN F; HU X. Effect of energy density and citric acid concentration on anthocyanins yield and solution temperature of grape peel in microwave-assisted extraction process. **Journal of Food Engineering**, v.109, p.274-280, 2012.

LI H; GUO A; WANG H. Review: Mechanisms of oxidative browning of wine. **Food Chemistry**, v.108, p.1–13, 2008.

MATEO J. J; MAICAS S. Valorization of winery and oil mill wastes by microbial technologies. **Food Research International**, v.73, p.13–25, 2015.

MIRABELLA N.; CASTELLANI, V.; SALA S. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. **Journal of Cleaner Production**, v.65, p.28-41, 2014.

MORAIS D. R.; ROTTA E. M.; SARGI S. C.; SCHMIDT E. M.; BONAFE E. G.; EBERLIN M. N.; SAWAYA A. C. H. F.; VISENTAINER J. V. Antioxidant activity, phenolics and UPLC-ESI(-)-MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. **Food Research International**, v.77, p.392-399, 2015.

MONTGOMERY D. C. **Design and analysis of experiments**. 8th Edition. Arizona: John Wiley Sons, Inc., 2013. 724 p.

MANTELL C; RODRÍGUEZ M; MARTÍNEZ DE LA OSSA E. Semi-batch extraction of anthocyanins from red grape pomace in packed beds: experimental results and process modelling. **Chemical Engineering Science**, v.57, p.3831–3838, 2002.

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

NONTASAN S; MOONGNGARM A; DEESEENTHUM S. Application of Functional Colorant Prepared from Black Rice Bran in Yogurt. **APCBEE Procedia**, v.2, p.62-67, 2012.

NOUR V; STAMPAR F; VEBERIC R; JAKOPIC J. Anthocyanins profile, total phenolics and antioxidant activity of black currant ethanolic extracts as influenced by genotype and ethanol concentration. **Food Chemistry**, v.141, p.961–966, 2013.

O'SHEA, N.; ARENDT, E. K.; GALLAGHER, E. Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.16, p.1-10, 2012.

OLIVEIRA C. M; FERREIRA A. C. S; FREITAS V; SILVA A. M. S. Review: Oxidation mechanisms occurring in wines. **Food Research International**, v.44, p.1115–1126, 2011.

PEREIRA-CARO G; WATANABE S; CROZIER A; FUJIMURA T; YOKOTA T; ASHIHARA H. Phytochemical profile of a Japanese black–purple rice. **Food Chemistry**, v.141, p.2821–2827, 2013.

RIBEIRO L. F; RIBANI R. H; FRANCISCO T. M. G; SOARES A. A; PONTAROLO R; HAMINIUK C. W. I. Profile of bioactive compounds from grape pomace (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) by spectrophotometric, chromatographic and spectral analyses. **Journal of Chromatography B**, v.1007, p.72–80, 2015.

RODRIGUEZ-SAONA, L.E.; WROLSTAD, R.E. Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. In R.E. WROLSTAD, **Current Protocols in Food Analytical Chemistry** (pp.F1 1.1-1.11). New York: John Wiley & Sons, 2001.

SAMOTICHA J; WOJDYLO A; GOLIS T. Phenolic composition, physicochemical properties and antioxidant activity of interspecific hybrids of grapes growing in Poland. **Food Chemistry**, v.215, p.263–273, 2017.

SILVA L. M. R; FIGUEIREDO E. A. T.; RICARDO N. M. P. S.; VIEIRA I. G. P.; FIGUEIREDO R. W.; BRASIL I. M.; GOMES C. L. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v.143, p.398-404, 2014.

SINELA A; RAWAT N; MERTZ C; ACHIR N; FULCRAND H; DORNIER M. Anthocyanins degradation during storage of *Hibiscus sabdariffa* extract and evolution of its degradation products. **Food Chemistry**, v.214, p.234–241, 2017.

SUI X; DONG X; ZHOU W. Combined effect of pH and high temperature on the stability and antioxidant capacity of two anthocyanins in aqueous solution. **Food Chemistry**, v.163, p.163-170, 2014.

TEIXEIRA A; BAENAS N; DOMINGUEZ-PERLES R; BARROS A; ROSA E; MORENO D. A; GARCIA-VIGUERA C. Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, p. 15638-15678, 2014.

VATAI T; ŠKERGET M; KNEZ Ž; KARETH S; WEHOWSKI M; WEIDNER E. Extraction and formulation of anthocyanin-concentrates from grape residues. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.45, p.32–36, 2008.

VARZAKAS T. H; LEACH G. C; ISRAILIDES C. J; ARAPOGLOU D. Theoretical and experimental approaches towards the determination of solute effective diffusivities in foods. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p.29–41, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Toxicological evaluation of certain food additives. **The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)**, 26th meeting, Geneva, 1982. Available in: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v17je05.htm>. Access in: July 25, 2016.

ZHANG Y; VAREED S. K; NAIR M. G. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. **Life Sciences**, v.76, p.1465-1472, 2005.

## 6. RESULTADOS

### ARTIGO

#### Otimização da extração de polifenóis do resíduo de uva e sua estabilidade durante armazenamento

### RESUMO

O objetivo dessa pesquisa foi extrair polifenóis de resíduo de uva proveniente da indústria de suco e avaliar sua estabilidade durante armazenamento. As extrações foram realizadas com etanol acidificado com ácido cítrico de acordo com o desenho Box-Behnken ajustado a três variáveis, temperatura, razão sólido:líquido e tempo. O teor de antocianinas totais, flavonóis totais e fenólicos totais dos extratos foram quantificados e analisados pela metodologia de superfície de resposta para determinar sua dependência às variáveis em estudo. A otimização de múltiplas respostas foi executada com a função de *desirability* para maximizar a extração. O extrato obtido com os parâmetros otimizados foi concentrado, armazenado por 83 dias à temperatura de 4°C e, periodicamente, utilizado para determinar o teor de antocianinas monoméricas e a porcentagem de cor polimérica. Com esses dados foram modeladas as cinéticas de reação. As condições de extração, temperatura de 60°C, a razão sólido:líquido de 1/25 g.mL<sup>-1</sup> e um tempo de 80 minutos, maximizaram a recuperação de antocianinas totais (30,96 mg.100g<sup>-1</sup>), de flavonóis totais (73,34 mg.100g<sup>-1</sup>) e fenólicos totais (856,78 mg EAG.100g<sup>-1</sup>). Essas condições foram determinadas para uma *desirability* global (*D*) de 0,77. O estudo da estabilidade indicou que tanto a degradação de antocianinas quanto a geração da cor polimérica seguem uma cinética de primeira ordem, com taxas de reação (*k*) de 4,10x10<sup>-3</sup> dias<sup>-1</sup> e 3,46x10<sup>-3</sup> dias<sup>-1</sup>, respectivamente. A degradação das antocianinas em 50%, ou seja, tempo de meia vida (*t*<sub>1/2</sub>) ocorreria aos 169 dias de armazenagem. O etanol acidificado com ácido cítrico pode ser utilizado com eficiência para extrair polifenóis de resíduos de uvas, com uma estabilidade razoável que permite armazená-lo para uso posterior como aditivo natural.

**Palavras-chaves:** Fitoquímicos, Antocianinas, desenho Box-Behnken, Cor polimérica.

## ABSTRACT

The objective of this research was to extract grape residue polyphenols from the juice industry and evaluate their stability during storage. The extractions were performed with acidified ethanol with citric acid according to the Box-Behnken design adjusted to three variables, temperature, solid/liquid ratio and time. The total anthocyanins, total flavonols and total phenolics contents of the extracts were quantified and analyzed by the response surface methodology to determine their dependence on the variables under study. The optimization of multiple responses was performed with the desirability function to maximize the extraction. The extract obtained with the optimized parameters was concentrated, stored for 83 days at 4°C and periodically used to determine the content of monomeric anthocyanins and percentage of polymeric color. With this, data the reaction kinetics were modeled. The extraction conditions, temperature of 60°C, the solid/liquid ratio of 1/25 g.mL<sup>-1</sup> and a time of 80 minutes, maximized the recovery of total anthocyanins (30.96 mg.100g<sup>-1</sup>), total flavonols (73.34 mg.100g<sup>-1</sup>) and total phenolics (856.78 mg EAG.100g<sup>-1</sup>). These conditions were determined for a global desirability (D) of 0.77. The stability study indicated that both anthocyanin degradation and polymeric color generation follow first order kinetics, with reaction rates (k) of 4.10x10<sup>-3</sup> days<sup>-1</sup> and 3.46x10<sup>-3</sup> days<sup>-1</sup>, respectively. The degradation of anthocyanins by 50%, ie half-life (t<sub>1/2</sub>) would occur at 169 days of storage. Ethanol acidified with citric acid can be efficiently used to extract polyphenols from grape residues with a reasonable stability that allows it to be stored for later use as a natural additive.

**Keywords:** Phytochemicals, Anthocyanins, Box-Behnken design, Polymeric color.

## 1. INTRODUÇÃO

O processamento de uva na elaboração de vinho e de suco gera abundante resíduo, ocasionando prejuízos econômicos para a indústria e danos ambientais quando não eliminado apropriadamente no meio ambiente (DEVESA-REY *et al.* 2011). O resíduo gerado nesses processos é de aproximadamente 30% em peso do fruto utilizado, constituído principalmente por sementes, cascas e engaço (TEIXEIRA *et al.* 2014). Muitas investigações destacam que o resíduo derivado da indústria de processamento de frutas são fontes potenciais de fitoquímicos bioativos (MORAIS *et al.* 2015), com propriedades antioxidantes (O'SHEA *et al.* 2012), dos quais o grupo dos compostos fenólicos tem sido reportado frequentemente (SILVA *et al.* 2014; BATAGLION *et al.* 2015).

Estudos científicos recentes indicam que o resíduo de uva proveniente da indústria vinícola, é fonte potencial de compostos fenólicos, com uma considerável concentração de diferentes tipos de antocianinas (GOULA *et al.* 2016; JARA-PALACIOS *et al.* 2015). As antocianinas são um subgrupo importante do grupo dos flavonoides devido a sua particular capacidade de conferir cor e, por apresentar potencial funcional, esses pigmentos, podem ser utilizados na elaboração de alimentos com propriedades funcionais (MANTELL *et al.* 2002; VATAI *et al.* 2008; AGUILERA *et al.* 2016).

O método de extração convencional sólido-líquido é utilizado para a obtenção de compostos bioativos, como carotenoides ou flavonoides. A extração ocorre como resultado da difusão do composto de interesse para o solvente e, este fenômeno é produzido pela afinidade e seletividade do solvente utilizado (MEIRELES, 2008). Os solventes como etanol, metanol e acetona são frequentemente utilizados na extração de fitoquímicos, e geralmente são acidificados com soluções aquosas de ácido clorídrico com a finalidade de melhorar a estabilidade das antocianinas (LEES; FRANCIS, 1972; RODRIGUEZ-SAONA; WROLSTAD, 2001). No processo de extração de antocianinas são também extraídos outros compostos associados como relatado pelos investigadores Pedro *et al.* (2016).

A preocupação com a utilização de solventes tóxicos na extração de fitoquímicos foi abordada por Pedro *et al.* (2016), que obtiveram bons resultados na extração de compostos

fenólicos, flavonóis e antocianinas em amostras de arroz preto, utilizando como solvente de extração o etanol acidificado com solução de ácido cítrico. Os principais fatores que influenciam significativamente a extração de fitoquímicos são: a temperatura, a concentração do solvente, o pH, a razão sólido:líquido e o tempo de extração (PEDRO *et al.* 2016; LI *et al.* 2012; IGNAT *et al.* 2011).

O resíduo da indústria de produção de suco de uva ainda tem sido pouco investigado, especialmente quanto aos parâmetros que influenciam na extração de fitoquímicos. Assim, a presente investigação teve como objetivo otimizar a extração de polifenóis presentes no resíduo oriundo da indústria de produção de suco de uva, utilizando como solvente de extração o etanol, acidificado com ácido cítrico bem como, avaliar a estabilidade do extrato otimizado concentrado em condições de armazenamento.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Amostra**

O resíduo industrial de uva Isabel (*Vitis labrusca*) congelado (25 Kg) foi cedido por uma empresa processadora de polpa congelada localizada no município de Goiana, Pernambuco. O resíduo de uva ao chegar ao Laboratório de Análises Físico-Químicas de Alimentos, do Departamento de Ciências Domésticas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco foi descongelado, homogeneizado e dividido em unidades amostrais de 800 g cada, acondicionadas à vácuo e armazenado sob congelamento ( $-18\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) até o momento de sua utilização.

### **2.2. Preparação da amostra**

Oito unidades amostrais foram selecionadas aleatoriamente e foram descongelados em temperatura de refrigeração ( $5^{\circ}\text{C}$  por 24 horas). O resíduo descongelado foi colocado em bandejas de aço inox para desidratar numa estufa (MARCONI, MA035, Brasil) com circulação de ar a  $40^{\circ}\text{C}$ , por 18 horas, até atingir um teor de umidade abaixo de 10%. O resíduo seco foi moído em moinho de facas refrigerado (TECNAL, TE-631/2, Brasil) por 1 minuto a 7.000 rpm. Em seguida o total do resíduo seco moído foi tamizada manualmente

com o auxílio de uma peneira de aço inoxidável (Bertel, Caieiras Brasil) de 42 mesh (355 µm de abertura). O resíduo seco com tamanho de partícula de 355 µm foi embalada à vácuo a 740 mmHg em seladora de vácuo (SELOVAC, 200B, Brasil), protegida da luz e conservada a  $-18\pm 1^{\circ}\text{C}$  até a execução dos experimentos de extração.

### 2.3. Reagentes

Os reagentes utilizados na extração foram, etanol absoluto 99,9% (Merck KGaA, Emsure, Alemanha) e ácido cítrico 99,5% (Química Moderna, Brasil). Os reagentes utilizados nas análises químicas da amostra e extrato concentrado foram ácido clorídrico, cloreto de potássio, acetato de sódio, clorofórmio, acetona adquiridos da Fmaia, Brasil. O reagente Folin-Ciocalteu's (Merck, Alemanha), ácido gálico 98% (Vetec Química fina Ltda, Brasil), carbonato de sódio (Vetec, Sigma-Aldrich, Brasil) e meta-bissulfito de potássio 96 % ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) (Dinâmica, Química Contemporânea Ltda, Brasil).

### 2.4. Umidade da amostra

A umidade do resíduo foi determinada antes e após a secagem em estufa, utilizando o aparelho de infravermelho (Marte, ID50, Brasil). Foi utilizado 1 grama do resíduo seco e 2 gramas do resíduo úmido e, a determinação foi realizada a  $105^{\circ}\text{C}$  e em triplicata.

### 2.5. Teor de antocianinas, flavonóis e fenólicos totais

Amostras de 3 gramas do resíduo úmido e 2 gramas do resíduo seco, foram adicionados de etanol absoluto acidificado com ácido clorídrico a 1,5 N (80:15 v/v) e deixadas em repouso com o solvente de extração por uma noite a  $4^{\circ}\text{C}$ . O extrato foi separado por filtração com papel filtro (Química Moderna, 20-25 µ, Brasil), e o resíduo lavado com o solvente de extração até a completa extração das antocianinas e o volume foi aferido para 100 mL. Após duas horas de repouso, as antocianinas e flavonóis totais foram determinados a partir das leituras das absorbâncias em espectrofotômetro UV-Visível (SHIMADZU, UV-1650PC, Japão) a 535 e 374 nm, respectivamente. Os cálculos foram realizados utilizando as Equações 1 e 2, sendo as antocianinas totais expressas em miligramas de cianidina-3 glicosídeo por 100 gramas da amostra e os flavonóis totais, em

miligramas equivalentes em quercetina por 100 gramas da amostra (LEES; FRANCIS, 1972).

$$\text{Antocianinas totais (mg. 100g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Absorbância}_{535 \text{ nm}} \times \text{fator diluição}}{98,2} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\text{Flavonóis totais (mg. 100g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Absorbância}_{374 \text{ nm}} \times \text{fator diluição}}{76,5} \quad (\text{Equação 2})$$

Os fenólicos totais foram quantificados de acordo com a metodologia proposta por Wettasinghe e Shahidi (1999) utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. A 0,5 mL do EA diluído (1 parte do extrato em 4 partes de água destilada) foi adicionada 8 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos foi adicionado 1 mL de solução saturada de carbonato de sódio e deixado em repouso por 1 hora em temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ). A absorbância foi registrada no comprimento de onda de 725 nm em espectrofotômetro UV-Visível. O teor de fenólicos totais foi calculado a partir de uma curva padrão construída com ácido gálico e, os resultados expressos em miligramas equivalentes em ácido gálico por 100 gramas de amostra ( $\text{mg.100g}^{-1}$  da amostra).

## 2.6. Avaliação da extração pela Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

A avaliação do processo de extração de polifenóis foi realizada utilizando o resíduo seco com tamanho de partícula média de 42 mesh. O efeito da temperatura, do tempo de extração e da razão sólido:líquido sobre a extração de polifenóis foi investigado. A extração foi conduzida de acordo com metodologia proposta de Pedro *et al.* (2016), com algumas modificações. Foram utilizados 2 gramas de resíduo para as extrações e como solvente de extração foi utilizado etanol acidificado com solução de ácido cítrico ( $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ) numa proporção de 80:20 (v/v) com a finalidade de atingir um pH menor do que 3.

**Tabela 1.** As variáveis independentes codificadas e as variáveis respostas.

Variáveis	Níveis		
	- 1	0	+1
Independentes:			
X <sub>1</sub> : Temperatura de extração (°C)	20	40	60
X <sub>2</sub> : Razão de solido/solvente (g.mL <sup>-1</sup> )	1/15	1/20	1/25
X <sub>3</sub> : Tempo de extração (min)	20	50	80
Dependentes:			
Y <sub>1</sub> : Antocianinas totais (mg.100g <sup>-1</sup> )			
Y <sub>2</sub> : Flavonóis totais (mg.100g <sup>-1</sup> )			
Y <sub>3</sub> : Fenólicos totais (mg EAG.100g <sup>-1</sup> )			

EAG: Equivalente em ácido gálico.

Os experimentos foram realizados seguindo o desenho Box-Behnken (BBD) ajustado para três variáveis independentes, obtendo-se um número de quinze ensaios, incluindo-se três repetições no ponto central. As variáveis e seus níveis, baixos e altos são mostrados na Tabela 1, as quais foram estabelecidas previamente de acordo com as experiências relatadas por Pedro *et al.* (2016). Na Tabela 2, verifica-se o planejamento experimental para o desenho Box-Behnken codificado, onde X<sub>1</sub> é a temperatura, X<sub>2</sub> é a razão sólido:líquido e X<sub>3</sub> é o tempo de extração.

**Tabela 2.** Planejamento experimental codificado Box-Behnken

Ensaios	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	-1	-1	0
2	-1	1	0
3	1	-1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	-1	0	1
7	1	0	-1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	-1	1
11	0	1	-1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

X<sub>1</sub> = temperatura; X<sub>2</sub> = razão solido/solvente; X<sub>3</sub> = tempo de extração.

O método de extração sólido-líquido utilizado nos experimentos foi realizado por imersão da amostra no solvente de extração com agitação constante de  $90\pm 2$  rpm, em evaporador rotatório (Marca, Laborota 4000) que permitiu controlar a temperatura de extração com precisão de  $\pm 3^\circ\text{C}$ . Após o término da extração a mistura amostra-solvente, foi filtrada e o volume foi aferido para 100 mL com o solvente de extração.

Após o processo de extração, os extratos foram armazenados sob temperatura de congelamento ( $-18\pm 1^\circ\text{C}$ ) em frascos de vidro âmbar de 100 mL. As extrações foram realizadas em triplicata para cada ensaio. As antocianinas totais, flavonóis totais e fenólicos totais foram determinados após 24 horas, como descrito no item 2.5. As variáveis respostas (antocianinas totais, flavonóis totais e fenólicos totais) foram submetidas a análise de regressão linear múltipla pela MSR, ajustado ao modelado da Equação 3:

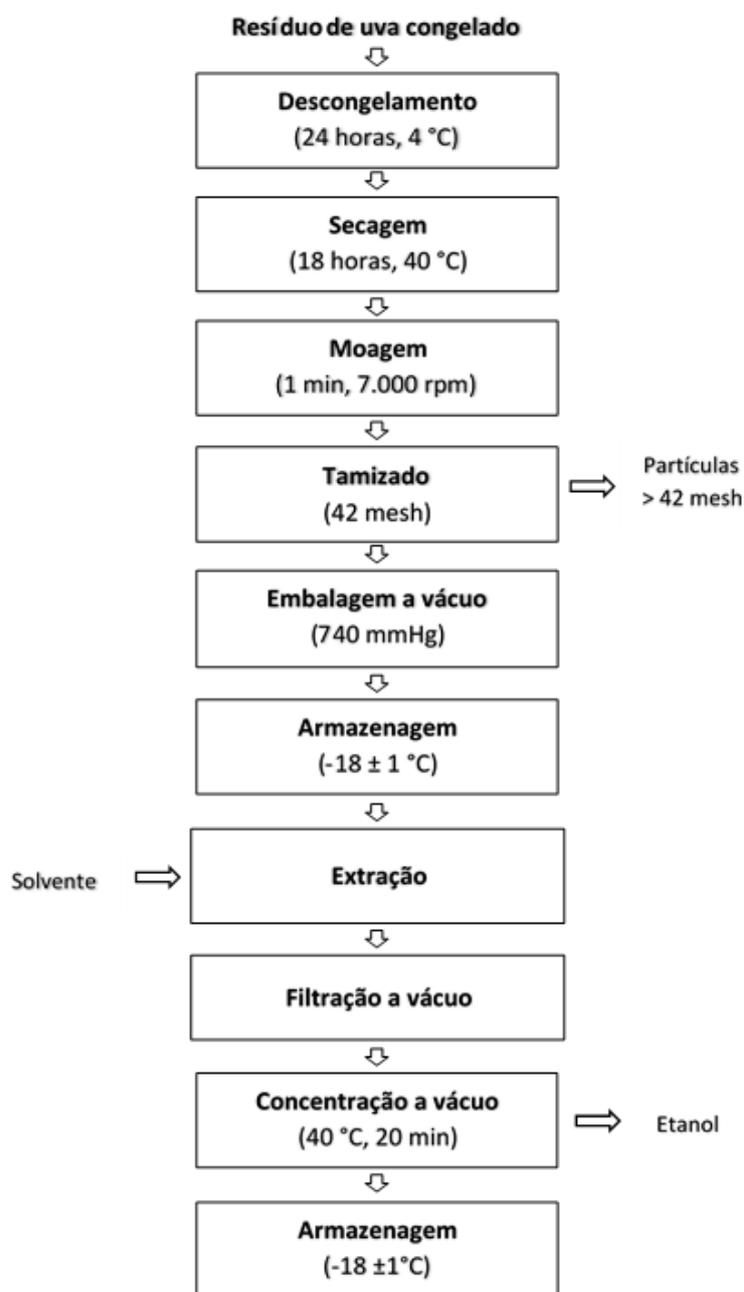
$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i>j}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (\text{Equação 3})$$

Na qual a função de resposta (Y), está integrada por componentes linear, quadrática e interativa. Onde Y, é a resposta prevista;  $\beta_0$ , denota o intercepto do modelo;  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  e  $\beta_{ij}$  representam os coeficientes dos componentes linear, quadrático e interativo do modelo, respectivamente.  $X_i$  e  $X_j$  são as variáveis independentes; e k representa o número de fatores que foram investigados.

## 2.7. Elaboração e caracterização físico-químico do extrato otimizado concentrado

O extrato otimizado concentrado foi elaborado seguindo o fluxograma mostrado na Figura 1, cada extração foi realizada com 20 g do resíduo seco. O processo foi constituído por todas as operações utilizadas na otimização, na qual foi adicionada a operação de concentração ao vácuo, com a finalidade de remover o etanol. A operação de extração dos polifenóis foi realizado de acordo com as condições otimizadas detalhadas no item 3.6. Após a concentração a vácuo foi obtido aproximadamente 200 mL de extrato otimizado concentrado por cada litro de extrato alcoólico e foram armazenados em frascos de vidro âmbar a  $-18\pm 1^\circ\text{C}$ .

**Figura 17.** Fluxograma da elaboração de extrato otimizado concentrado do resíduo de uva.



Os extratos concentrados foram utilizados para quantificar o teor de antocianinas monoméricas, de flavonóis totais e de fenólicos totais. O teor de antocianinas monoméricas foi quantificado pelo método de pH diferencial (LEE *et al.*, 2005) e expresso em miligramas de Malvidina-3,5-diglicosídeo por litro de solução ( $\text{mg.L}^{-1}$ ). O teor de flavonóis totais com resultados expressos em miligramas equivalente em quercetina por litro de solução ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) e o teor de fenólicos totais, com resultados expressos em

miligramas equivalentes em ácido gálico por litro de solução (mg EAG.L<sup>-1</sup>) foram determinados de acordo com a metodologia descrita no item 2.5.

O pH foi determinado com o auxílio de um pH-metro, TECNAL, Tec-3MP, Brasil (AOAC 981.12, 2002). O teor de sólidos solúveis, expressos em °Brix foi determinado diretamente por meio de um refratômetro automático a 25°C (REICHERT, r2i300, USA). A atividade de água foi medida pelo método direto a 25°C com ajuda de um analisador Aqualab 4T (DECAGON DEVICES, Brasil). A cor do extrato otimizado concentrado foi determinada utilizando os parâmetros CIELAB (L\*a\*b\*) proposto pela Comissão Internacionale de l'Eclairage (CIE) (McGUIRE 1992), em 6 mL do extrato que foi transferido para um recipiente de plástico branco (diâmetro 4,5 cm e com profundidade de 1cm), e as leituras foram realizadas com um colorímetro (Konica Minolta, CR-400, Japão).

## 2.8. Cor polimérica

A porcentagem da cor polimérica do extrato otimizado concentrado foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Giusti e Wrolstad (2001), utilizando a Equação 4. A partir do extrato otimizado concentrado foram realizadas duas diluições; uma com solução de bissulfito e a outra, com água destilada. Ambas as diluições foram submetidas a leituras em absorvâncias de 420 nm para pigmentos marrons, 520 nm para antocianinas monoméricas e 700 nm para correção das leituras.

$$\text{Cor polimerica (\%)} = \left( \frac{\text{Cor polimerica}}{\text{Densidade da cor}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

A cor polimérica foi calculada com a Equação 5, utilizando as leituras das absorvâncias da dissolução tratada com bissulfito enquanto que, a densidade da cor foi determinada com a Equação 6, utilizando as leituras das absorvâncias sem tratamento de branqueamento. Onde FD é o fator de diluição e A é a absorvância.

$$\text{Densidade da cor} = [(A_{420\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) + (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})] \times \text{FD} \quad (\text{Equação 5})$$

$$\text{Cor polimérica} = [(A_{420\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) + (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})] \times \text{FD} \quad (\text{Equação 6})$$

## 2.9. Estudo da estabilidade

O extrato otimizado concentrado foi acondicionado em frascos âmbar de 20 mL e armazenado à temperatura de 4°C em uma estufa refrigerada (BOD, TECNAL, TE-371, Brasil). A degradação das antocianinas foi monitorada pela determinação do teor das antocianinas monoméricas pelo método de pH diferencial (LEE *et al.*, 2005) e da cor polimérica (GIUSTI; WORLSTAD, 2001). Essas determinações foram realizadas inicialmente a cada 3 dias, e após o dia 21 a cada 5 dias por um período máximo de 83 dias. A cinética de degradação das antocianinas monoméricas e o incremento da cor polimérica foram modeladas utilizando o modelo de primeiro grau como observado pelos pesquisadores Sharma *et al.* (2016), utilizando a Equação 7.

$$C = C_0 e^{\pm k \cdot t} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde,  $t$  é o tempo,  $k$  é a constante de velocidade da cinética de primeira ordem,  $C_0$  e  $C$  são as concentrações de antocianinas monoméricas ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) e cor polimérica, no tempo zero e no tempo  $t$ , respectivamente. O tempo de meia vida das antocianinas monoméricas foi calculado mediante a Equação 8.

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \quad (\text{Equação 8})$$

## 2.10. Análise estatística

Os dados experimentais foram expressos como a média das réplicas e o desvio padrão (Média  $\pm$  DP). Os dados dos ensaios para otimização do processo de extração foram submetidos a análise de normalidade pelo teste de Anderson-Darling para determinar se os dados seguem distribuição normal. Em seguida foi testada a homogeneidade das variâncias pelo teste de Brown-Forsythe. A seguir foi realizada a análise de variância (ANOVA) para determinar as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos, enquanto o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) foi usado para comparar as médias dos tratamentos. Foi também calculado o coeficiente de correlação de Pearson para determinar a relação linear dos dados das variáveis respostas (antocianinas totais, flavonóis totais e

fenólicos totais). Após a comprovação da existência de diferenças significativas entre os tratamentos, os dados das variáveis respostas foram submetidos a análise de regressão linear múltipla pela MSR. A qualidade do ajuste do modelo aos dados experimentais foi avaliada pelo teste de falta de ajuste, teste de normalidade dos resíduos, coeficiente de regressão ordinário e ajustado. A otimização das multirrespostas do processo de extração foi realizada utilizando a função de *desirability* (DERRINGER; SUICH, 1980).

A cinética de degradação de antocianinas e a formação da cor polimérica do extrato otimizado concentrado em armazenamento foram ajustadas por regressão não linear ao modelo de primeira ordem. A normalidade dos resíduos e o coeficiente de regressão ajustada foram utilizados para avaliar a qualidade do ajuste. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software MATLAB<sup>®</sup> R2010a 7.10.0.499 (MathWorks, USA) e Design-Expert 10 (Stat-Ease, versão 10).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Caracterização do resíduo úmido e seco**

Inicialmente a amostra úmida e seca foi analisada para determinar o teor de umidade, antocianinas, flavonóis e fenólicos totais, cujos resultados estão mostrados na Tabela 3. O teor de umidade do resíduo úmido está próximo ao encontrado pelos investigadores Minjares-Fuentes *et al.* (2014), que reportaram em média 62 g.100g<sup>-1</sup> base úmida (b.u.) de umidade em resíduo proveniente da indústria de vinho, constituído em maior proporção de sementes e cascas. A diferença no teor de umidade do resíduo úmido encontrado é explicada por vários fatores, como a diferença entre uma variedade e outra, condições de cultivo, condições de processamento e constituição final do resíduo.

A determinação da umidade no resíduo seco moído e peneirado (Figura 2) foi realizada para assegurar que a umidade estivesse abaixo de 10% e para validar as condições de secagem. Segundo reportado pelos investigadores Ribeiro *et al.* (2015), a combinação de 80°C e 36 horas para secagem de resíduo de uva em estufa com circulação de ar proporcionou umidades finais na faixa de 2,80 g.100g<sup>-1</sup> a 13,63 g.100g<sup>-1</sup>. Na presente investigação optou-se por reduzir o máximo possível o tempo e temperatura de secagem,

com objetivo de não propiciar reações indesejadas devido à exposição da amostra a temperaturas elevadas por longos períodos de tempo, ocasionado a degradação dos fitoquímicos. O valor de umidade, encontrado no resíduo seco (Tabela 3), foi obtido uma combinação de temperatura e tempo inferior em 50% e dentro da faixa reportada por Ribeiro *et al.* (2015).

**Figura 2.** Resíduo seco de uva com tamanho de partícula média 42 mesh



**Tabela 3.** Umidade, antocianinas totais, fenólicos totais e flavonóis totais, do resíduo de uva úmido e seco.

Amostra	Umidade (%)*	Antocianinas totais (mg.100g <sup>-1</sup> )*	Flavonóis totais (mg.100g <sup>-1</sup> )*	Fenólicos totais (mg EAG.100g <sup>-1</sup> )*
RU	51,39±1,53	11,51±0,95	21,65±0,64	273,20 ±18,27
RS	5,33±0,44	28,32±0,34	58,95±0,48	804,26 ±44,53

\* Valores médios (n=3) ±desvio padrão; RU: resíduo úmido; RS: resíduo seco; EAG: Equivalente em ácido gálico.

O teor de antocianinas totais do resíduo de uva foi determinado antes e depois da desidratação (Tabela 3). Com base no teor de umidade encontrado no resíduo antes da secagem, pode-se inferir que as condições de secagem empregadas foram apropriadas e não ocasionaram aparentemente perdas significativas de antocianinas. O teor de antocianinas encontrado na amostra foi inferior aos reportados por outros investigadores. Liazid *et al.* (2011), em estudo comparativo entre dois métodos de extração, um convencional e outro assistido por micro-ondas, utilizando cascas de uva da variedade Tintilla de Rota (*V. vinifera*), reportaram teores de 154,59 mg.100g<sup>-1</sup> e 185,79 mg.100g<sup>-1</sup>,

respectivamente. Em outro estudo comparativo com resíduo de uva da variedade Monatrell (*V. vinifera*) proveniente de quatro processos de vinificação, foram encontrados teores de antocianinas que variaram de 49 mg.100g<sup>-1</sup> até 130 mg.100g<sup>-1</sup> (GÓMEZ-PLAZA *et al.*, 2006).

Os pesquisadores Rockenbach *et al.* (2011) reportaram que o teor de antocianinas monoméricas em resíduo liofilizado oriundo da vinificação de uva da variedade Isabel (*V. labrusca*), foi em média 184 mg.100g<sup>-1</sup>. Contudo, sabe-se que o resíduo de uva da vinificação é constituído principalmente por sementes e cascas, com presença mínima de engaço (5 – 6 %), (TOURNOUR *et al.*, 2015) as quais ficam em contato com o mosto por um período de tempo, dependendo do tipo de vinificação, o que influencia no teor de antocianinas final no resíduo. Portanto, o teor de antocianinas encontrado na amostra estudada pode ter sido influenciado por diversos fatores como: processo industrial a que foi submetido, maior presença de engaço, entre outros. Destaca-se que na presente investigação foi utilizado o resíduo integral oriundo da indústria de suco, constituído por cascas, sementes e engaço, contendo os dois últimos, pouco ou nenhum conteúdo de antocianinas.

O teor de flavonóis totais encontrado no resíduo úmido e seco (Tabela 3), foi semelhante ao reportado por Harsha *et al.*, (2013) em estudo com cascas de uva vermelha de dez cultivares provenientes do processo de vinificação. Barcia *et al.*, (2014) reportaram teor de flavonóis totais em uvas *in natura* de 28,15 mg.100g<sup>-1</sup> (Cabernet Franc) e 14,05 mg.100g<sup>-1</sup> (Cabernet Sauvignon); em casca de uva fermentada derivada da vinificação de 77,76 mg.100g<sup>-1</sup> (Cabernet Franc) e 53,55 mg.100 g<sup>-1</sup> (Cabernet Sauvignon); na borra da vinificação de 127,42 mg.100g<sup>-1</sup> (Cabernet Franc) e 134,71 mg.100g<sup>-1</sup> (Cabernet Sauvignon).

O teor de fenólicos totais encontrado no resíduo úmido e seco, alcançaram valores de 273,20±18,27 e 804,26±44,53 mg EAG.100g<sup>-1</sup>, respectivamente. Os investigadores Harsha *et al.* (2013) reportaram teores de 1.200 a 5.360 mg EAG.100g<sup>-1</sup> de compostos fenólicos presentes na casca de uvas vermelhas de diferentes cultivares derivado da vinificação. A menor concentração de fenólicos encontrada no presente trabalho pode ter sido decorrente do processo industrial para obtenção do suco de uva que por passar por tratamento térmico,

poderia causar uma diminuição no teor de compostos fenólicos, além da variedade da uva, condições de cultivo, entre outros.

### 3.2. Ensaios de extração

Na Tabela 4, se encontra os resultados das análises dos extratos obtidos a partir da farinha do resíduo seco. O teor de antocianinas, flavonóis e fenólicos totais, presentes nos extratos do resíduo seco, estiveram compreendidos nas faixas de  $16,49 \pm 1,55$  (ensaio 2) a  $31,25 \pm 1,86$  (ensaio 4) em  $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ;  $55,32 \pm 1,67$  (ensaio 5) a  $77,92 \pm 2,42$  (ensaio 8) em  $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  e  $586,31 \pm 7,84$  (ensaio 6) a  $880,95 \pm 15,19$  (ensaio 8) em  $\text{mg EAG} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ , respectivamente.

**Tabela 4.** Antocianinas totais, flavonóis totais e fenólicos totais, de extratos do resíduo seco, obtidos de acordo com o desenho Box-Behnken

Ensaios	Antocianinas totais* ( $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ )	Flavonóis totais* ( $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ )	Fenólicos totais* ( $\text{mg EAG} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ )
1	$16,91 \pm 1,22^e$	$56,12 \pm 2,00^f$	$625,00 \pm 13,94^{jk}$
2	$16,49 \pm 1,55^e$	$56,06 \pm 2,56^f$	$625,00 \pm 11,81^{jk}$
3	$21,19 \pm 1,71^{bcd}$	$68,01 \pm 3,02^b$	$785,71 \pm 5,91^b$
4	$31,25 \pm 1,86^a$	$75,88 \pm 3,99^a$	$742,56 \pm 4,65^c$
5	$18,26 \pm 1,03^{cde}$	$55,32 \pm 1,67^f$	$623,51 \pm 16,75^{jk}$
6	$18,46 \pm 1,03^{cde}$	$58,89 \pm 3,43^{cdef}$	$586,31 \pm 7,84^l$
7	$19,97 \pm 0,73^{bcde}$	$65,84 \pm 1,07^{bd}$	$651,79 \pm 19,07^{fghij}$
8	$29,24 \pm 1,71^a$	$77,92 \pm 2,42^a$	$880,95 \pm 15,19^a$
9	$17,29 \pm 1,10^{de}$	$59,57 \pm 1,95^{cdef}$	$636,16 \pm 8,05^{fghik}$
10	$19,42 \pm 1,07^{bcde}$	$59,98 \pm 1,04^{cdef}$	$671,13 \pm 16,15^{eg}$
11	$19,94 \pm 1,63^{bcde}$	$59,94 \pm 2,86^{cdef}$	$665,92 \pm 7,18^{eh}$
12	$22,72 \pm 1,93^b$	$65,35 \pm 2,76^{be}$	$699,40 \pm 17,34^{de}$
13	$18,85 \pm 0,31^{bcde}$	$60,72 \pm 0,83^{bf}$	$663,69 \pm 6,82^{ei}$
14	$18,06 \pm 0,56^{cde}$	$59,58 \pm 0,93^{cdef}$	$671,88 \pm 8,05^{ef}$
15	$21,89 \pm 2,16^{bc}$	$65,89 \pm 3,62^{bc}$	$708,33 \pm 7,84^{cd}$

\* Valores médios ( $n=3$ ) $\pm$ desvio padrão; EAG: equivalente em ácido gálico; Médias nas colunas, seguidas por letras iguais, não diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. EAG; equivalente em ácido gálico.

O teste de normalidade mostrou que o teor de antocianinas, flavonóis e fenólicos totais não segue a distribuição normal ( $p>0,05$ ). Enquanto que o teste de homogeneidade

das variâncias realizado pelo teste de Brown-Forsythe mostrou que todos os grupos de dados são homocedásticos ( $p > 0,05$ ). A análise de variância permitiu determinar que existe diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos para cada grupo de variáveis respostas. Enquanto que diferenças significativas entre as médias dos tratamentos foram encontradas para todos os grupos de dados das variáveis respostas com o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), como mostrado na Tabela 4. O valor do coeficiente de correlação de Pearson entre antocianinas e flavonóis totais foi de 0,9408, entre antocianinas e fenólicos totais foi de 0,7886 e entre flavonóis e fenólicos totais de foi 0,8749. Esses resultados indicam que existe um alto grau de dependência estatística linear entre os grupos de dados analisados.

Os resultados do teste de Normalidade para todos os grupos de dados sugerem que há possibilidade de que a interpretação e inferência a partir dos testes estatísticos paramétricos utilizados podem não ser confiáveis (SHAPIRO; WILK, 1965). Mas, por outro lado, os dados são homocedásticos, e assim, confirma-se que se cumprem os pressupostos de forma parcial, necessários para realizar testes paramétricos e análise de regressão (GRANATO *et al.*, 2014). O pressuposto da normalidade pode afetar a performance do teste ANOVA e a análise de regressão linear múltipla. Entretanto, Norman (2010) concluiu que as estatísticas paramétricas são robustas em relação à violação deste pressuposto.

Frequentemente, dados que não seguem a distribuição normal são transformados antes de realizar testes paramétricos. Os pesquisadores Granato *et al.*, (2014) chamam a atenção para evitar essas transformações, uma vez que a variável transformada perde sua identidade absoluta. Com o objetivo de validar o resultado dos testes ANOVA realizados com os dados das variáveis respostas, foi testada a normalidade dos resíduos (HOFFMANN, 2006). Os resíduos seguiram a distribuição normal, o que permite inferir que o resultado da análise de variância é confiável. Portanto, dispensa-se a necessidade de transformar os dados originais que não seguem a distribuição normal.

### 3.3. Superfície de resposta para a extração de antocianinas totais

A Tabela 5 demonstra os resultados da análise de regressão múltipla efetuada para as antocianinas totais. Os dados se ajustaram ao modelo utilizado, apresentando um  $R^2$

ordinário = 0,931 e  $R^2$  ajustado = 0,81. Esses resultados indicam que o modelo ajustado obtido explica em 81% a variação da variável resposta.

**Tabela 5.** Coeficientes de regressão do modelo quadrático ajustado para extração de antocianinas totais.

Parâmetros	Coeficiente de			
	regressão	EP	tStat	p-Valor
Intercepto	19,6022	1,0903	17,9781	$9,7788 \times 10^{-6}$
X <sub>1</sub>	3,9416	0,6676	5,9034	0,0019
X <sub>2</sub>	1,9495	0,6676	2,9198	0,0330
X <sub>3</sub>	1,7979	0,6676	2,6927	0,0431
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	2,6175	0,94425	2,7720	0,0392
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	2,2658	0,9442	2,3996	0,0616
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,1649	0,9442	0,1747	0,8681
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1,7489	0,9828	1,7794	0,1352
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,1080	0,9828	0,1099	0,9167
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0,1313	0,9828	0,1336	0,8988

X<sub>1</sub>: Temperatura (°C); X<sub>2</sub>: Razão sólido:líquido (g.mL<sup>-1</sup>); X<sub>3</sub>: Tempo (min); EP: Erro padrão da estimativa; tStat: Estatística *t*.

Os coeficientes dos componentes lineares da temperatura (X<sub>1</sub>), relação sólido:líquido (X<sub>2</sub>), tempo (X<sub>3</sub>) e a interação entre as duas (X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>) foram significativas ( $p \leq 0,05$ ) e positivas o que indicam que esses componentes tendem a incrementar o valor do conteúdo de antocianinas totais. Em estudo semelhante, Arici *et al.*, (2016) encontraram que os fatores temperatura e tempo influenciaram significativamente na extração de antocianinas a partir de resíduos de pétalas de tulipa (*Tulipa gesneriana* L.). Similarmente na extração de antocianinas a partir de açáí (*Euterpe oleracea*) foi encontrado que a temperatura teve um efeito positivo e significativo na extração desse pigmento (POMPEU, 2009).

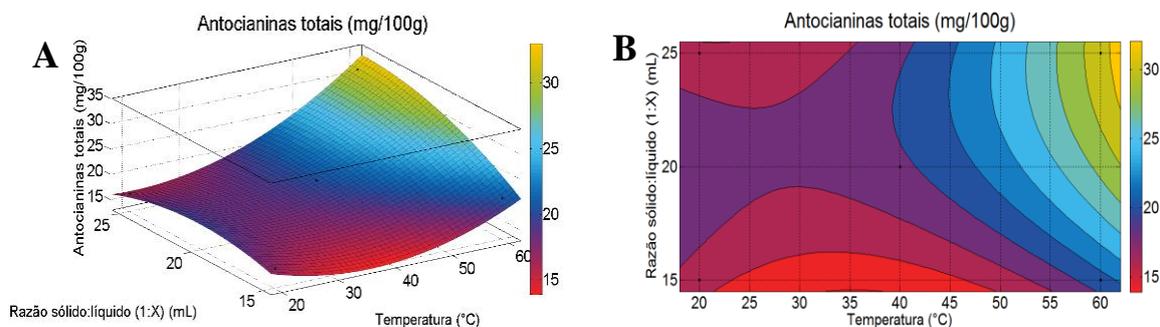
Efeitos significativos devido a temperatura também foram encontrados na extração de antocianinas a partir de sementes de *Nitraria tangutorun* (SANG *et al.*, 2017). Em outro estudo, investigando a extração de antocianinas de diferentes materiais vegetais, e também foi reportado que a temperatura e o tipo de solvente influenciaram significativamente na extração (WANG *et al.*, 2016). Na Equação 9, mostra-se o modelo ajustado, com os coeficientes associados aos componentes lineares, quadráticos, de interação dos

componentes lineares e o intercepto do modelo, obtidos por regressão com as variáveis independentes codificadas. O efeito das variáveis em estudo é melhor visualizado nas superfícies de respostas e gráficos de contorno como mostrado nas Figuras 3, 4 e 5.

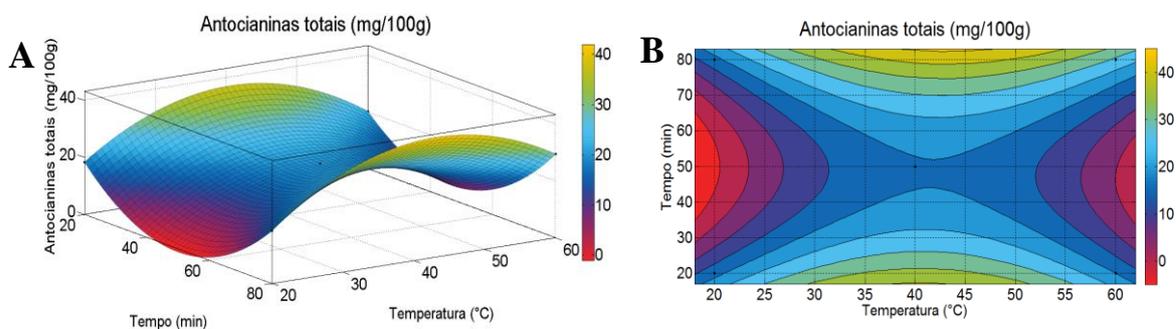
$$\text{Antocianinas totais (mg. 100g}^{-1}\text{)} = 19,6022 + 3,9416X_1 + 1,9495X_2 + 1,7979X_3 + 2,6175X_1X_2 + 2,2658X_1X_3 + 0,1649X_2X_3 + 1,7489X_1^2 + 0,1080X_2^2 + 0,1313X_3^2$$

(Equação 9)

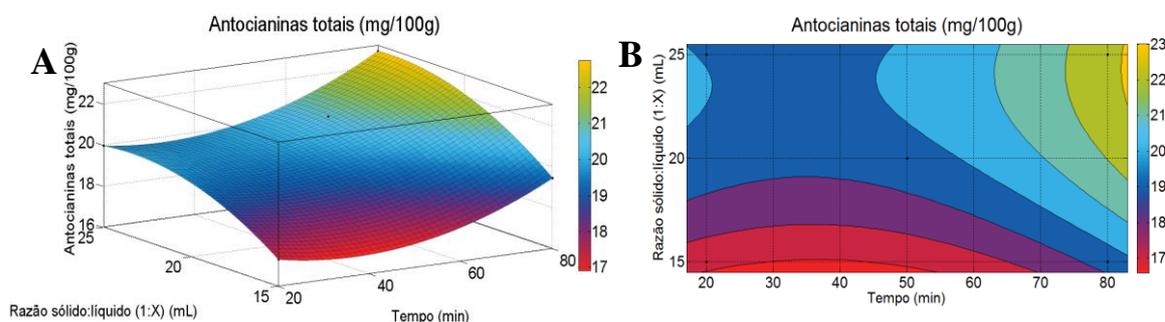
**Figura 3.** Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) da temperatura versus razão sólido:líquido da extração de antocianinas totais



**Figura 4.** Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) da temperatura versus tempo da extração de antocianinas totais



**Figura 5.** Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) da razão sólido:líquido versus tempo da extração de antocianinas totais



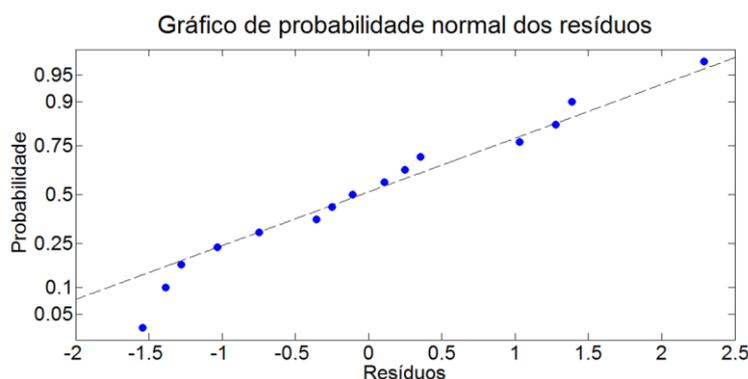
A qualidade do ajuste foi avaliada pelo teste de falta de ajuste, obtendo-se um  $P_{Falta\ de\ ajuste} = 0,7852$ , como mostrado na Tabela 6. Esse valor foi menor ao encontrado nas Tabelas, o que indica que não existe falta de ajuste significativa no nível de significância de  $\alpha = 0,05$ . Entretanto, também foi testada a normalidade dos resíduos gerados pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo, utilizando-se o teste de Anderson-Darling e o método gráfico. Ambos mostraram que os resíduos seguem a distribuição normal ( $p > 0,05$ ) como pode ser visualizado na Figura 6.

**Tabela 6.** Resumo do teste ANOVA do ajuste das antocianinas totais ao modelo quadrático

Fonte	SQ	GL	QM	Teste F	p-Valor
Total	257,74	14	18,41		
Modelo	239,91	9	26,656	7,4741	0,01966
Linear	180,56	3	60,187	16,876	0,00477
Não-linear	59,347	6	9,8912	2,7734	0,14137
Resíduo	17,832	5	3,5665		
Falta de ajuste	9,6441	3	3,2147	0,78518	0,60228
Erro puro	8,1884	2	4,0942		

SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio.

**Figura 6.** Gráfico de probabilidade normal dos resíduos para o modelo quadrático ajustado aos teores de antocianinas totais



### 3.4. Superfície de resposta para a extração de flavonóis totais

A Tabela 7 mostra os resultados da análise de regressão múltipla efetuada para os flavonóis totais. Os dados se ajustaram bem ao modelo utilizado, apresentando um  $R^2$  ordinário = 0,9453 e  $R^2$  ajustado = 0,8469, esses resultados indicam que o modelo ajustado obtido explica em 84% a variação dos teores de flavonóis totais obtidos nos ensaios.

**Tabela 7.** Coeficientes de regressão do modelo quadrático ajustado para extração de flavonóis totais

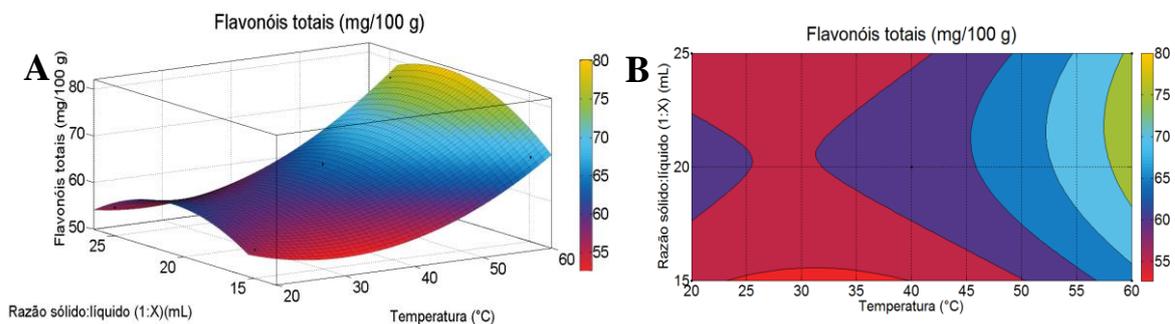
Parâmetros	Coeficiente de regressão	EP	tStat	p-Valor
Intercepto	62,0644	1,5439	40,1993	$1,796 \times 10^{-7}$
X <sub>1</sub>	7,6575	0,9455	8,0992	0,0004
X <sub>2</sub>	1,6950	0,9455	1,7928	0,1329
X <sub>3</sub>	2,6833	0,9455	2,8381	0,0363
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1,9817	1,3371	1,4821	0,1984
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	2,1283	1,3371	1,5918	0,1723
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	1,2517	1,3371	0,9361	0,3922
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	2,6194	1,3917	1,8822	0,1185
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-0,6672	1,3917	-0,4794	0,6519
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	-0,1889	1,3917	-0,1357	0,8973

X<sub>1</sub>: Temperatura (°C); X<sub>2</sub>: Razão sólido:líquido (g.mL<sup>-1</sup>); X<sub>3</sub>: Tempo (min); EP: Erro padrão da estimativa; tStat: Estatística *t*.

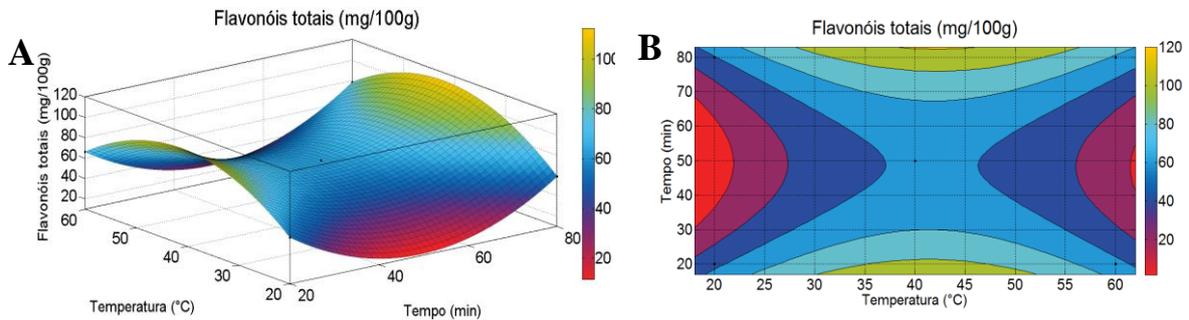
Os coeficientes dos componentes lineares da temperatura ( $X_1$ ), tempo ( $X_3$ ) e do intercepto foram significativos ( $p \leq 0,05$ ) e positivos, o que indicam que esses componentes tendem a incrementar o valor do conteúdo dos flavonóis totais. A extração de flavonóis totais obtidos nesta investigação foi superior ao reportado pelos investigadores Brianceau *et al.*, (2016). Eles reportaram um teor máximo de  $56,02 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$  na extração com solvente assistido com descargas elétricas de alta tensão, utilizando engaço de uva da variedade Cabernet Franc. O tempo também teve influência significativa na extração de flavonóis a partir de flores de cítricos e resíduos de uva, com solvente assistida por ultrassom (YANG *et al.*, 2010; GONZÁLEZ-CENTENO *et al.*, 2014). Na Equação 10, mostra-se o modelo ajustado, com os coeficientes associados aos componentes lineares, quadráticos, de interação dos componentes lineares e o intercepto do modelo, obtidos pela regressão utilizando as variáveis independentes codificadas. O efeito das variáveis em estudo sobre o teor de flavonóis totais é melhor visualizado nas superfícies de respostas e nos gráficos de contorno (Figuras 7, 8 e 9).

$$\text{Flavonóis totais (mg} \cdot 100\text{g}^{-1}) = 62,06 + 7,65X_1 + 1,69X_2 + 2,68X_3 + 1,98X_1X_2 + 2,12X_1X_3 + 1,25X_2X_3 + 2,61X_1^2 - 0,66X_2^2 - 0,18X_3^2 \quad (\text{Equação 10})$$

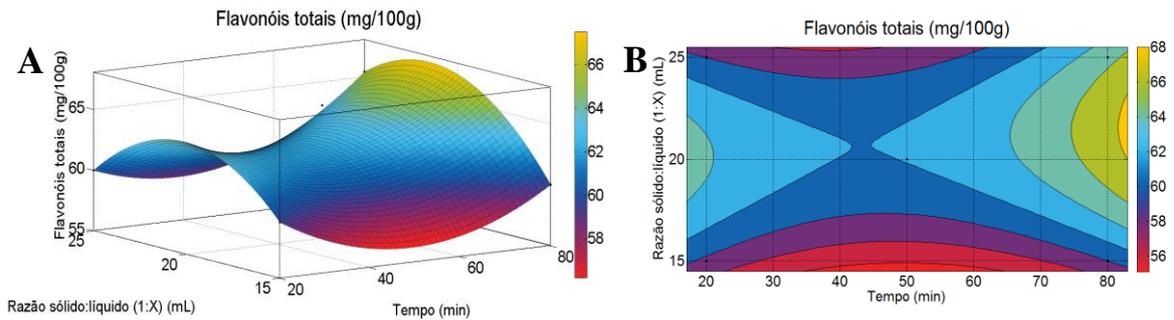
**Figura 7.** Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) da temperatura versus razão sólido:líquido da extração de flavonóis totais.



**Figura 8.** Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) da temperatura versus tempo da extração de flavonóis totais.



**Figura 9.** Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) da razão sólido:líquido versus tempo da extração de flavonóis totais.



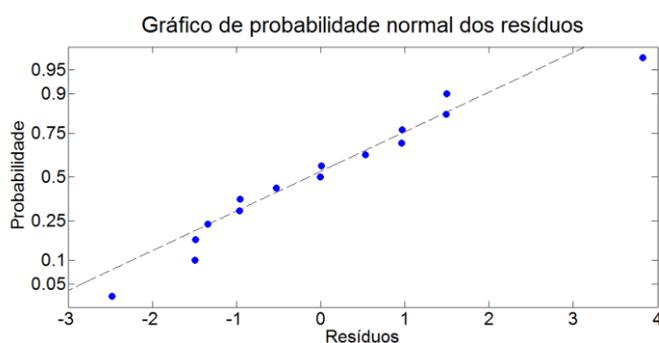
A qualidade do ajuste foi avaliada pelo teste de falta de ajuste, obtendo-se um  $P_{Falta\ de\ ajuste} = 0,3897$  (Tabela 8). Esse valor foi menor do que o encontrado nas tabelas, o que indica que não existe falta de ajuste significativa no nível de significância de  $\alpha = 0,05$ . Também foi testada a normalidade dos resíduos gerados pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo, utilizou-se o teste de Anderson-Darling e o método gráfico. Ambos mostram que os resíduos seguem a distribuição normal ( $p > 0,05$ ) como pode ser visualizado na Figura 10.

**Tabela 8.** Resumo do teste ANOVA do ajuste dos flavonóis totais ao modelo quadrático

Fonte	SQ	GL	QM	Teste F	p-Valor
Total	654,07	14	46,72		
Modelo	618,32	9	68,702	9,6073	0,01132
Linear	549,68	3	183,23	25,623	0,00183
Não-linear	68,634	6	11,439	1,5996	0,31138
Resíduo	35,755	5	7,1511		
Falta de ajuste	13,191	3	4,397	0,38973	0,77592
Erro puro	22,564	2	11,282		

SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio.

**Figura 10.** Gráfico de probabilidade normal dos resíduos para o modelo quadrático ajustado aos teores de flavonóis totais



### 3.5. Superfície de resposta para a extração de compostos fenólicos totais

A Tabela 9 demonstra os resultados da análise de regressão linear múltipla efetuada para os fenólicos totais. Os dados se ajustaram bem ao modelo utilizado, apresentando um  $R^2$  ordinário = 0,9414 e  $R^2$  ajustado = 0,8359. Esses resultados indicam que o modelo ajustado obtido explica em 83% a variação da variável resposta.

**Tabela 9.** Coeficientes de regressão do modelo ajustado para extração dos fenólicos totais.

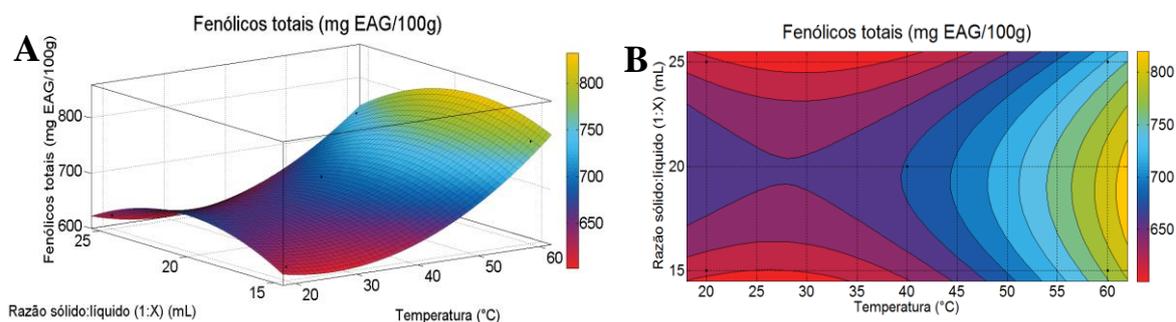
Parâmetros	Coeficiente de			
	regressão	EP	tStat	p-Valor
Intercepto	681,3000	17,4467	39,0504	2,075x10 <sup>-7</sup>
X <sub>1</sub>	75,1483	10,6839	7,0338	0,00089
X <sub>2</sub>	1,8604	10,6839	0,1741	0,8686
X <sub>3</sub>	32,5521	10,6839	3,0468	0,0285
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	-10,7875	15,1093	-0,7139	0,5072
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	66,5925	15,1093	4,4074	0,0069
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	-0,3716	15,1093	-0,0246	0,9813
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	15,3775	15,7262	0,9778	0,3731
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-2,1083	15,7262	-0,1341	0,8986
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	-11,0367	15,7262	-0,7018	0,5141

X<sub>1</sub>: Temperatura (°C); X<sub>2</sub>: Razão sólido:líquido (g.mL<sup>-1</sup>); X<sub>3</sub>: Tempo (min); EP: Erro padrão da estimativa ; tStat: Estatística *t*.

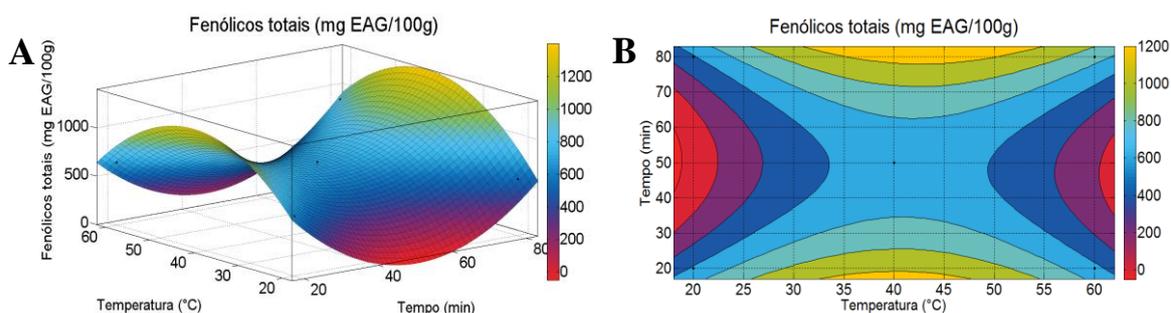
Os coeficientes dos componentes lineares da temperatura (X<sub>1</sub>), tempo (X<sub>3</sub>), da interação entre a temperatura com o tempo (X<sub>1</sub>X<sub>3</sub>) e do intercepto foram significativos (p<0,05) e positivos, o que indicam que esses componentes tendem a incrementar o valor do conteúdo dos fenólicos totais. A temperatura de extração foi identificada como um fator de grande importância na extração de compostos fenólicos pelos métodos convencional e assistida por micro-ondas. De forma geral, um aumento da temperatura ajuda a diminuir a viscosidade do solvente, aumentando a difusividade dos fitoquímicos para o solvente (BUBALO *et al.*, 2016; BI *et al.*, 2013). Em outro estudo foi encontrado que a temperatura e a razão sólido:líquido foram fatores críticos na extração de compostos fenólicos a partir de resíduo de uva (PINELO *et al.*, 2005). Em um estudo semelhante, a temperatura, relação amostra-solvente e a concentração de solvente influenciaram significativamente na extração de fenólicos de *Berberis asiática* (BELWAL *et al.*, 2016). Na Equação 11, mostra-se o modelo ajustado, com os coeficientes obtidos pela regressão utilizando as variáveis independentes codificadas. O efeito das variáveis em estudo sobre o teor de fenólicos totais é melhor visualizado nas superfícies de respostas e nos gráficos de contorno (Figuras 11, 12 e 13).

$$\text{Fenólicos totais (mg EAG. 100g}^{-1}\text{)} = 681,30 + 75,14X_1 + 1,86X_2 + 32,55X_3 - 10,78X_1X_2 + 66,59X_1X_3 - 0,37X_2X_3 + 15,37X_1^2 - 2,10X_2^2 - 11,03X_3^2 \quad (\text{Equação 11})$$

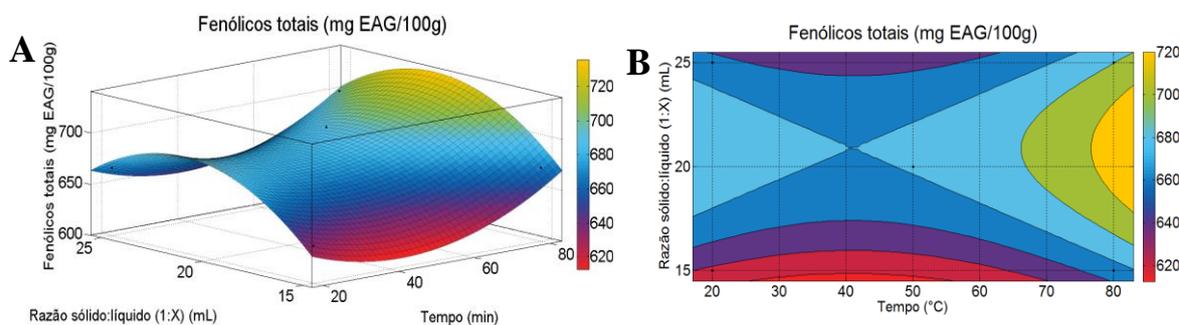
**Figura 11.** Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) da temperatura versus razão da extração de fenólicos totais.



**Figura 12.** Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) da temperatura versus tempo da extração de fenólicos totais.



**Figura 13.** Superfície de resposta (A) e gráfico de contorno (B) da razão sólido:líquido versus tempo da extração de fenólicos totais.



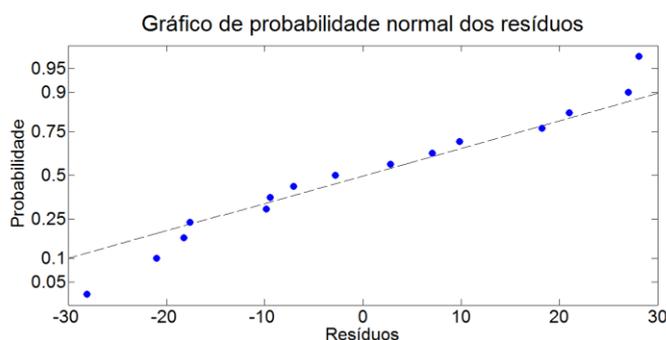
A qualidade do ajuste foi avaliada pelo teste de falta de ajuste, obtendo-se um  $P_{Falta\ de\ ajuste} = 2,0277$  (Tabela 10). Esse valor foi menor ao encontrado nas Tabelas, o que indica que não existe falta de ajuste significativa no nível de significância de  $\alpha = 0,05$ . Também foi testada a normalidade dos resíduos gerados pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo, utilizando-se o teste de Anderson-Darling e o método gráfico. Ambos mostram que os resíduos seguem a distribuição normal ( $p > 0,05$ ) como pode ser visualizado na Figura 14.

**Tabela 10.** Resumo do teste ANOVA do ajuste dos fenólicos totais ao modelo quadrático

Fonte	SQ	GL	QM	Teste F	p-Valor
Total	77903	14	5564,5		
Modelo	73337	9	8148,5	8,9234	0,013346
Linear	53683	3	17894	19,596	0,003404
Não-linear	19654	6	3275,6	3,5871	0,091188
Resíduo	4565,8	5	913,16		
Falta de ajuste	3436,1	3	1145,4	2,0277	0,34714
Erro puro	1129,7	2	564,85		

SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio.

**Figura 14.** Gráfico de probabilidade normal dos resíduos para o modelo quadrático ajustado aos teores de fenólicos totais



### 3.6. Otimização da extração

A partir das Equações 12, 13 e 14, foi realizada a otimização de multirrespostas utilizando a função de *desirability*. Essas equações apenas mostram os componentes

associados à coeficientes que foram significativos na análise pela MSR. A *desirability* individual ( $d_1$ ,  $d_2$  e  $d_3$ ) foi calculada para antocianinas totais ( $Y_1$ ), flavonóis totais ( $Y_2$ ) e fenólicos totais ( $Y_3$ ) pela transformação unilateral. A *desirability* global ( $D$ ) da otimização foi obtida combinando as *desirabilities* individuais mediante a média geométrica, como mostrado na Figura 15 e 16.

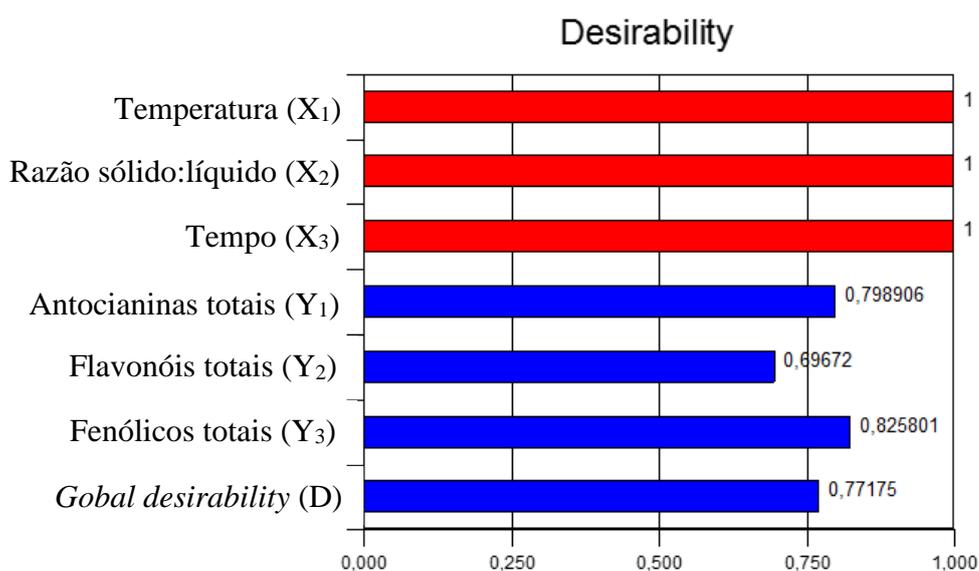
$$Y_1 = 20,66 - 3,94X_1 - 1,94X_2 - 1,79X_3 + 2,61X_1X_2 \quad (\text{Equação 12})$$

$$Y_2 = 63,00 + 7,65X_1 + 2,68X_3 \quad (\text{Equação 13})$$

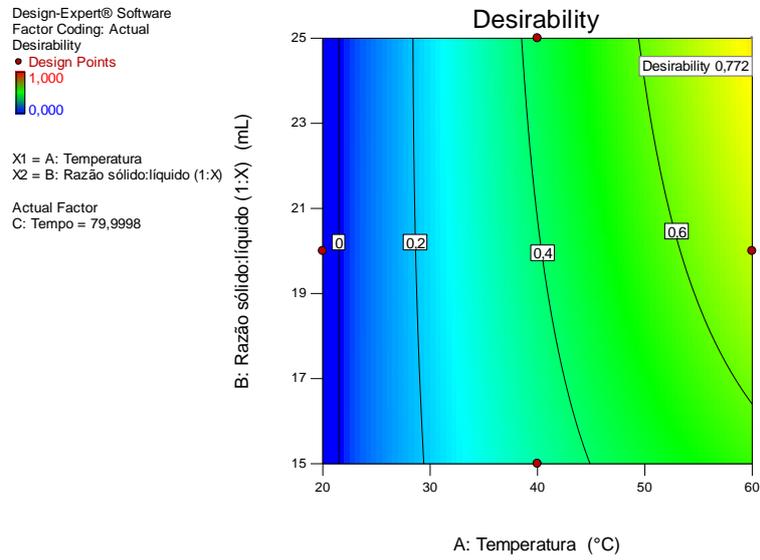
$$Y_3 = 682,49 - 75,14X_1 - 32,55X_3 + 66,59X_1X_3 \quad (\text{Equação 14})$$

A otimização mostrou que para uma  $D$  igual a 0,772, pode-se obter os melhores rendimentos na extração de polifenóis, com teores máximos de antocianinas totais de 30,966 mg.100g<sup>-1</sup> (Figura 17); flavonóis totais de 73,34 mg.100g<sup>-1</sup> (Figura 18) e fenólicos totais de 856,78mg EAG.100g<sup>-1</sup> (Figura 19). Esses valores estão dentro da faixa experimental observada. Assim, as condições que maximizam as três variáveis respostas obtida a partir da  $D$  foram temperatura ( $X_1$ ) de 60°C, razão sólido:líquido ( $X_2$ ) de 1/25 g.mL<sup>-1</sup> e um tempo de extração ( $X_3$ ) de 80 minutos.

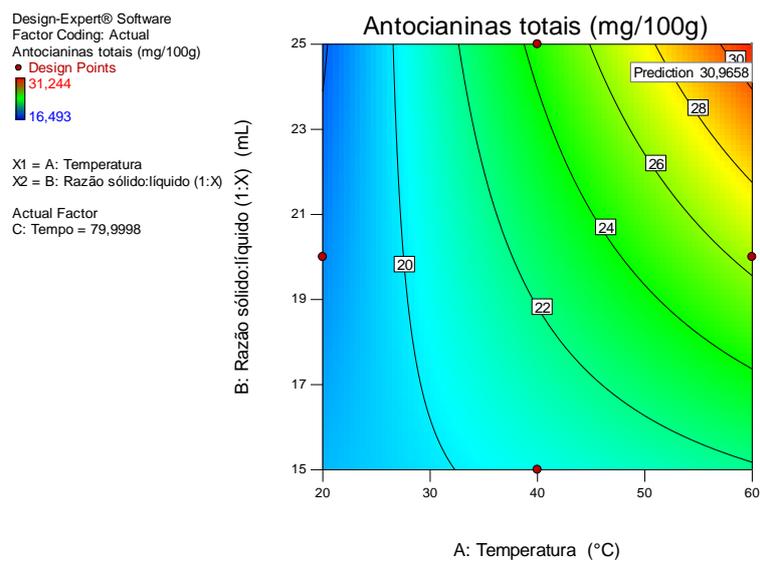
**Figura 15.** *Desirabilities* individuais para as variáveis independentes, respostas e global



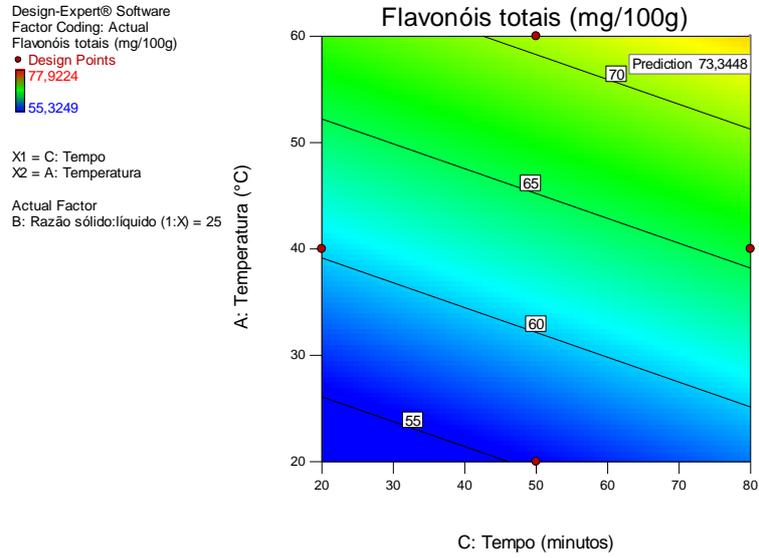
**Figura 16.** Gráfico de contorno da *desirability* global (D) versus as variáveis independentes



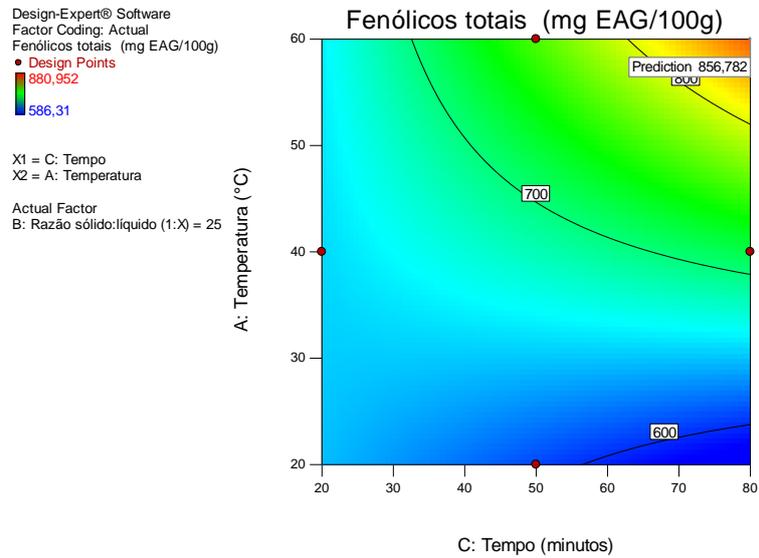
**Figura 17.** Gráfico de contorno da otimização da extração de antocianinas totais de acordo com a *desirability* global



**Figura 18.** Gráfico de contorno da otimização da extração de flavonóis totais de acordo com a *desirability* global.



**Figura 19.** Gráfico de contorno da otimização dos flavonóis totais de acordo com a *desirability* global.



As condições otimizadas de extração obtidos na presente pesquisa foram semelhantes aos resultados da otimização de extração assistida por micro-ondas relatados por Li *et al.* (2012), reportando uma temperatura superficial de 60,8°C, a concentração de ácido cítrico de 0,79 mol.L<sup>-1</sup> e a proporção sólido:líquido de 1:20 (g.mL<sup>-1</sup>). Os mesmos pesquisadores advertem que o uso de uma energia e potência de micro-ondas maior poderia levar a degradação das antocianinas por efeito da temperatura produzida pela fricção das moléculas de água (LI *et al.*, 2012). No presente trabalho observou-se que a temperatura é também o fator mais importante, e de acordo com a otimização, na temperatura de 60°C obteve-se a maior extração de antocianinas.

O teor de flavonóis totais obtido nas condições otimizadas na presente pesquisa foi superior ao observado nas condições otimizadas para a extração aquosa assistida por ultrassom investigada por González-Centeno *et al.* (2014), que reportaram um teor de flavonóis totais de 2,04 mg EQ.100g<sup>-1</sup> no resíduo de uva (cascas e sementes). A maior concentração de flavonóis totais observada nas condições de extração otimizada no presente estudo, pode ter ocorrido porque foi utilizado um resíduo que continha cascas, sementes e engaços, e assim, ter influenciado no teor final desse fitoquímico. A extração de flavonóis a partir de hastes de uva do cultivar Cabernet Franc, assistida com descargas elétricas de alta tensão foi otimizada, conseguindo obter um teor máximo de 55,5 mg EQ.100g<sup>-1</sup> (BRIANCEAU *et al.*, 2016), sendo esse resultado, próximo ao encontrado neste trabalho.

Nas condições otimizadas para extração de fenólicos totais foi obtida maior extração de fenólicos em comparação ao reportado pelos pesquisadores González-Centeno *et al.* (2014), que reportaram uma extração máxima de 32,31 mg EAG.100g<sup>-1</sup>, na extração aquosa assistida por ultrassom a partir de resíduo de uva. Em outro estudo comparativo entre a extração aquosa convencional com agitação mecânica e acústica, González-Centeno *et al.* (2014) relataram que a extração assistida por ultrassom conseguiu um maior rendimento na extração de compostos fenólicos, alcançando um teor máximo de 770 mg EAG.100g<sup>-1</sup> em resíduo seco de uva e que esse valor foi 3,3 vezes maior que o obtido na extração convencional. Em um estudo de valorização de resíduo seco de uva, Goula *et al.* (2016) relataram que a extração conduzida com mistura de solventes etanol-água assistida

por ultrassom, proporcionou uma extração máxima de fenólicos totais de 957 mg EAG.100g<sup>-1</sup>, cujo resultado é próximo ao encontrado neste trabalho.

### 3.7. Elaboração e caracterização físico-química do extrato otimizado concentrado

O extrato otimizado concentrado foi elaborado seguindo o fluxograma mostrado na Figura 1. Na Tabela 11 são mostrados os resultados da caracterização do extrato otimizado concentrado. O teor de sólidos solúveis é influenciado pelos fitoquímicos, fibras solúveis, açúcares e outros compostos solúveis que foram extraídos junto aos polifenóis, o ácido cítrico utilizado na acidificação do solvente de extração também contribuiu no teor final dos sólidos solúveis. O valor de atividade de água do extrato foi de 0,94, e indica que uma quantidade importante da água presente no extrato e que está disponível para reações químicas e enzimáticas, e que poderiam acelerar a degradação dos fitoquímicos, em especial das antocianinas (FENNEMA *et al.*, 2010).

**Tabela 11.** Características físico-químicas do extrato otimizado concentrado

Analise	Valor*
Sólidos solúveis (°Brix)	34,07±2,18
Atividade de água	0,94±0,01
Cor:	
L*	24,32±1,88
a*	26,32±4,12
b*	5,14±3,27
pH	2,14±0,15
Antocianinas monoméricas (mg.L <sup>-1</sup> )	39,95±1,39
Flavonóis totais (mg.L <sup>-1</sup> )	118,49±1,21
Fenólicos totais (mg EAG.L <sup>-1</sup> )	2.257,44±78,14
Cor polimérica (%)	46,63±1,46

\*Valores médios ± Desvio padrão (n=3); EAG: Equivalente em ácido gálico.

O valor de pH do extrato de 2,14; pode ser considerado apropriado para manter a estabilidade das antocianinas. Sui *et al.* (2014), em estudo avaliando o efeito combinado do pH e temperatura sobre a estabilidade de antocianinas em extrato aquoso de arroz preto, observaram que em extratos com pH de 2,2 a velocidade de degradação das antocianinas era mais lenta em comparação aos extratos com valor de pH superior. Pedro *et al.* (2016), também reportaram que em extratos antociânicos de arroz preto, com valor de pH de 3,15;

houve degradação das antocianinas em cerca de 50 %. De acordo com Francis (1989), pH superior a 3 leva a uma diminuição da estabilidade das antocianinas. Portanto, à medida que o pH se incrementa, se produz a transformação molecular do cátion flavylium na forma quinoidal, que é muito susceptível ao ataque nucleofílico, pelas moléculas da água, resultando na formação de carbinol pseudobase e chalcona (FENNEMA *et al.*, 2010).

A intensidade da cor vermelha é constatada pelo valor do parâmetro  $a^*$  positivo, que foi de 26,32. A cor do extrato também apresenta um componente amarelo, como indica o valor positivo do parâmetro  $b^*$  que foi de 5,14, porém, de menor intensidade; enquanto que a Luminosidade ( $L^*$ ) foi de 24,32. Os parâmetros de cor de vinhos sem envelhecimento foram relatados pelos os investigadores Avizcuri *et al.* (2016), que reportaram que o parâmetro  $a^*$  variou de 33,2 a 53,3; o parâmetro  $b^*$  variou de 5,1 a 27,6 e o parâmetro  $L^*$  variou de 31,5 a 64,6. Esses valores são maiores ao observado neste trabalho. Malien-Aubert *et al.* (2001), reportaram que em um estudo de estabilidade da cor da bebida modelo sem açúcar, com pH 4, elaborada a partir de extrato antociânico do resíduo de uva, apresentou um valor do Chroma ( $C^*$ ) ( $C^* = (a^2 + b^2)^{1/2}$ ) de 16,3 inferior ao encontrado no presente trabalho ( $C^*=26,81$ ). Esse parâmetro indica que quanto maior for o valor do  $C^*$ , maior é a saturação da cor, ou seja, mais intensa é a cor.

Os três grupos de fitoquímicos avaliados neste estudo apresentaram uma concentração média; para antocianinas monoméricas de 39,95 mg.L<sup>-1</sup>; flavonóis totais de 118,49 mg.L<sup>-1</sup> e fenólicos totais de 2.257,44 mg EAG.L<sup>-1</sup>. O teor, relativamente baixo, de antocianinas monoméricas encontrado no extrato pode ser justificado pelo fato de que o resíduo utilizado no presente estudo é proveniente da uva do cultivar Isabel que foi relatado por conter baixo teor de antocianina em relação às outras cultivares de uvas vermelhas (YAMAMOTO *et al.*, 2015). Além disso, o processo industrial que as uvas foram submetidas para obtenção do suco pode ter influenciado no teor final de antocianinas monoméricas no extrato, uma vez que essa suposição se baseia na porcentagem de cor polimérica encontrada no extrato, que alcançou um valor médio de 46,63%.

Não obstante o teor de antocianinas encontrado no extrato tenha sido relativamente baixo, a concentração dos outros fitoquímicos presentes no extrato o tornam potencial

aditivo natural com capacidade antioxidante. Extratos semelhantes ao obtido neste trabalho estão sendo aplicados na indústria de carnes com a finalidade de reduzir a utilização de nitritos (GRECCO *et al.*, 2016), no enriquecimento com compostos fenólicos de iogurtes (CHOUCHOULI *et al.*, 2013), entre outras.

### 3.8. Estabilidade de antocianinas no extrato otimizado concentrado

A Tabela 12 apresenta os valores médios do teor de antocianinas monoméricas e a porcentagem de cor polimérica, determinados periodicamente durante 83 dias de armazenamento a 4°C.

**Tabela 12.** Variação do teor de antocianinas monoméricas e porcentagem da cor polimérica no extrato otimizado concentrado armazenado em temperatura de 4°C

Dias	Antocianinas monoméricas (mg.L <sup>-1</sup> )*	Cor polimérica* (%)
0	40,73±0,94 <sup>a</sup>	45,40±1,00 <sup>l</sup>
3	37,95±3,50 <sup>ab</sup>	46,17±0,17 <sup>kl</sup>
6	37,27±2,08 <sup>ac</sup>	48,63±0,47 <sup>ghijk</sup>
12	37,73±1,81 <sup>ad</sup>	49,76±0,49 <sup>ghij</sup>
15	37,99±1,93 <sup>ac</sup>	48,58±0,42 <sup>ghijk</sup>
18	35,99±1,48 <sup>bcdeg</sup>	49,97±0,42 <sup>fj</sup>
21	36,49±0,91 <sup>acdf</sup>	49,96±0,40 <sup>fi</sup>
31	35,51±1,71 <sup>bcdeh</sup>	51,38±0,25 <sup>defh</sup>
36	35,18±1,25 <sup>bcdei</sup>	51,40±0,51 <sup>dfg</sup>
41	34,46±0,88 <sup>bcdej</sup>	52,86±0,46 <sup>cf</sup>
46	32,50±0,64 <sup>fghijl</sup>	53,39±0,51 <sup>cd</sup>
51	31,85±1,21 <sup>fghijm</sup>	53,35±0,59 <sup>ceg</sup>
58	32,77±0,79 <sup>efk</sup>	55,83±0,52 <sup>ac</sup>
63	30,51±0,63 <sup>ijk</sup>	55,36±0,42 <sup>bc</sup>
68	29,54±1,24 <sup>klmn</sup>	57,03±1,06 <sup>a</sup>
73	31,79±1,96 <sup>fhijn</sup>	58,63±1,69 <sup>a</sup>
78	30,22±0,59 <sup>jk</sup>	55,77±2,95 <sup>adef</sup>
83	31,56±1,17 <sup>ghijk</sup>	57,75±0,99 <sup>ab</sup>

\* Média (n=3) ± desvio padrão

Médias nas colunas, seguidas por letras iguais, não diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Na Tabela 13, observa-se os parâmetros cinéticos obtidos para o modelo cinético de primeira ordem, tanto para a degradação de antocianinas monoméricas, como para o incremento da cor polimérica. Os modelos ajustados apresentaram um coeficiente de regressão ordinário ( $R^2$ ) de 0,818 e 0,834. Esses coeficientes indicam que 81,8% e 83,4% da variação dos dados experimentais são explicados por esses modelos, para a degradação de antocianinas monoméricas e o incremento da cor polimérica, respectivamente.

Na Figura 20, são mostradas as curvas das cinéticas de degradação de antocianinas monoméricas e do incremento da cor polimérica. Pode-se constatar visualmente uma tendência decrescente do teor de antocianinas com o decorrer do tempo e no caso da cor polimérica, uma tendência crescente. A constante da reação ( $k$ ) da degradação de antocianinas monoméricas foi de  $4,096 \times 10^{-3}$  dias<sup>-1</sup>. A partir desse valor se calculou o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) que foi de 169,22 dias. Durante esse período de armazenamento o teor de antocianinas monoméricas diminuiria em 50%.

**Tabela 13.** Parâmetros cinéticos da degradação de antocianinas monoméricas e geração de cor polimérica do extrato otimizado concentrado em armazenamento a 4°C

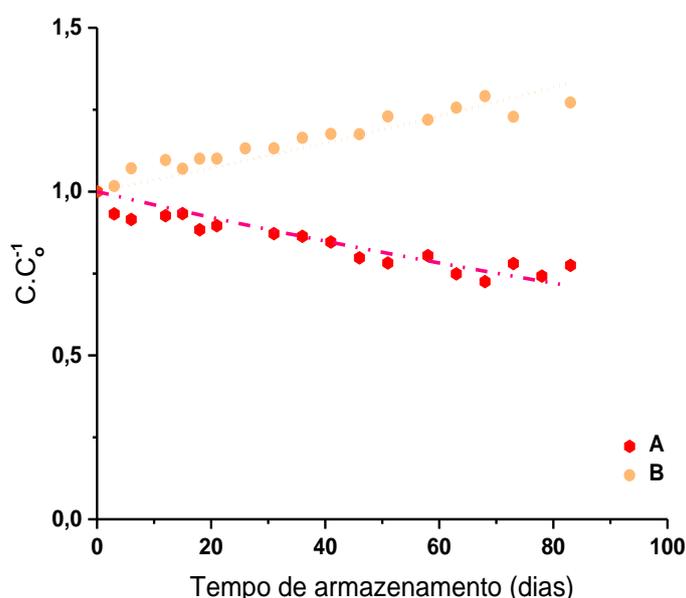
Variáveis	$C_0$	$k_1$ (dias <sup>-1</sup> )*	$t_{1/2}$ (dias)	EP	$R^2$
Antocianinas (mg.L <sup>-1</sup> )	40,73	$4,096 \times 10^{-3}$	169,22	0,00021921	0,818
Cor polimérica (%)	45,39	$3,465 \times 10^{-3}$	-	0,00015091	0,834

\*Constante da reação do modelo de primeira ordem;  $C_0$ : concentração inicial;  $t_{1/2}$ : tempo de media vida; EP: Erro padrão da estimativa;  $R^2$ : coeficiente de determinação ordinário.

Em um estudo de degradação de antocianinas em extratos aquosos de *Hibiscus sabdariffa*, durante armazenamento a 4°C, a constante de reação foi de  $2,07 \times 10^{-3}$  dias<sup>-1</sup> (Sinela *et al.*, 2017), valor inferior em aproximadamente 50 % ao encontrado neste estudo. Embora o pH do extrato do resíduo de uva estivesse dentro da faixa que permitisse uma melhor estabilidade das antocianinas (FRANCIS 1989), a degradação observada neste estudo, pode ter sido catalisada pelos produtos da degradação de antocianinas, pelos fenólicos, açúcares e outros compostos (FENNEMA *et al.*, 2010), originados no processamento da uva e que foram extraídos junto com os fitoquímicos analisados.

O valor da porcentagem de cor polimérica inicial do extrato que foi de 45,39% revela o efeito do processamento da uva na indústria sobre a degradação de antocianinas. Kirca *et al.* (2003) reportaram em seu estudo com suco concentrado de laranja vermelha e tratamentos térmicos, que a cor polimérica aumentava conforme fosse a intensidade do tratamento térmico. Os investigadores Cisse *et al.* (2012), mostraram que a aplicação de processos térmicos, como a pasteurização e o branqueamento afetaram a estabilidade das antocianinas durante o armazenamento, com uma taxa de degradação a 4°C de  $4,99 \times 10^{-3} \text{ dia}^{-1}$ , valor muito próximo ao encontrado neste estudo.

**Figura 20.** Cinéticas da degradação de antocianinas monoméricas (A) e do incremento da cor polimérica (B) em extrato otimizado concentrado de resíduo de uva armazenado a 4°C



A cinética do incremento da porcentagem de cor polimérica no extrato teve uma taxa de reação de  $3,465 \times 10^{-3} \text{ dias}^{-1}$ . O aumento da cor polimérica é relacionado diretamente à degradação das antocianinas (CISSE *et al.*, 2012). A cor polimérica em extratos antociânicos é indicativo de que estão acontecendo reações de condensação entre antocianina-antocianina, fenólicos-antocianinas, taninos-antocianinas e outros compostos não fenólicos (GIUSTI; WROLSTAD, 2001), ocasionando, assim, uma alteração na cor.

#### 4. CONCLUSÃO

A avaliação e a otimização da extração de polifenóis do resíduo de uva derivado da indústria de suco com etanol acidificado com ácido cítrico mostraram resultados que permitem afirmar que a extração foi bem-sucedida. Contudo, observou-se que o parâmetro temperatura é o fator que teve maior impacto na extração, assim, o incremento da temperatura aumentou o rendimento da extração para os três fitoquímicos analisados. O fator tempo também foi um fator que influenciou significativamente na extração para os três fitoquímicos. Enquanto que a razão sólido:líquido foi apenas significativo para a extração de antocianinas. O modelo utilizado para o ajuste dos dados experimentais foi significativo, embora apenas componentes lineares e de interação foram significativos.

O extrato obtido de forma geral é rico em polifenóis e do ponto de vista toxicológico é seguro, uma vez que no seu processo de obtenção apenas são utilizados etanol aquoso e ácido cítrico, ambos considerados atóxicos. Portanto, o extrato pode ser utilizado na formulação de produtos alimentícios de forma segura.

O estudo de estabilidade permitiu modelar as cinéticas de degradação de antocianinas monoméricas e o incremento da cor polimérica. Os resultados mostram que o etanol acidificado com ácido cítrico usado na extração de polifenóis tem um efeito positivo na estabilidade de antocianinas sob refrigeração.

## 5. REFERÊNCIAS

ARICI M; KARASU S; BASLAR M; TOKER O. S; SAGDIC O; KARAAGACLI M. Tulip petal as a novel natural food colorant source: Extraction optimization and stability studies. **Industrial Crops and Products**, v.91, p.215-222, 2016.

AVIZCURI J. M; SÁENZ-NAVAJAS M. P; ECHÁVARRI J. F; FERREIRA V; FERNÁNDEZ-ZURBANO P. Evaluation of the impact of initial red wine composition on changes in color and anthocyanin content during bottle storage. **Food Chemistry**, v.213, p.123–134, 2016.

AGUILERA Y; MOJICA L; REBOLLO-HERNANZ M; BERHOW M; MEJÍA E. G; MARTÍN-CABREJAS M. A. Black bean coats: New source of anthocyanins stabilized by b-cyclodextrin copigmentation in a sport beverage. **Food Chemistry**, v.212, p.561-570, 2016.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL. **Official Methods of Analysis**. 16ed. Gaithersburg: AOAC International, 2002.

BUBALO M. C; 'CURKO N; TOMAŠEVIC´ M; GANIC´ K. K; REDOVNIKOVIC´ I. R. Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. **Food Chemistry**, v.200, p.159–166, 2016.

BATAGLION G. A; SILVA F. M. A; EBERLIN M. N; KOOLEN H. H. F. Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v.180, p.280-287, 2015.

BRIANCEAU S; TURK M; VITRAC X; VOROBIEV E. High voltage electric discharges assisted extraction of phenolic compounds from grape stems: Effect of processing parameters on flavan-3-ols, flavonols and stilbenes recovery. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.35, p.67–74, 2016.

BELWAL T; DHYANI P; BHATT I. D; RAWAL R. S; PANDE V. Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Berberis asiatica* fruits using response surface methodology (RSM). **Food Chemistry**, v.207, p.115–124, 2016.

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.

BI W; TIAN M; ROW K. H. Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. **Journal of Chromatography A**, v.1285, p.22–30, 2013.

CHOUCHOULI V; KALOGEROPOULOS N; KONTELES S. J; KARVELA E; MAKRIS D. P; KARATHANOS V. T. Fortification of yoghurts with grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. **LWT-Food Science and Technology**, v.53, p.522-529, 2013.

CISSE M; VAILLANT F; KANE A; NDIAYEA O; DORNIER M. Impact of the extraction procedure on the kinetics of anthocyanin and colour degradation of roselle extracts during storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.92, p.1214-1221, 2012.

DEVESA-REY R; VECINO X; VARELA-ALENDE J. L; BARRAL M T; CRUZ J. M; MOLDES A. B. Country Report: Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. **Waste Management**, v.31, p.2327–2335, 2011.

DERRINGER G; SUICH R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v.12, p.214-219, 1980.

FENNEMA O.; PARKIN K.; DAMODARAN S. Química de alimentos. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900p.

FRANCIS F. J. Food colourants: Anthocyanins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.28, p.273-314, 1989.

GRECCO G. B; YAGI R. N; RIBEIRO F. A; BATISTA W. L; ANDREO M. A; SINNECKER P; VENTURINI A.C. Extracts of grape juice industrial residues as natural antioxidant in Brazilian sausage (linguiça) with reduced nitrite. **Meat Science**, v.112, p.122, 2016.

GOULA, A. M.; THYMIATIS, K.; KADERIDES, K. Valorization of grape pomace: Drying behavior and ultrasound extraction of phenolics. **Food and Bioprocess Processing**, v.100, p.132-144, 2016.

GRANATO D; CALADO V. M. A; JARVIS B. Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology. **Food Research International**, v.55, p.137-149, 2014.

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

GONZÁLEZ-CENTENO M. R; KNOERZER K; SABAREZ H; SIMAL S; ROSSELLÓ C; FEMENIA A. Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.) – A response surface approach. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.21, p.2176–2184, 2014.

GÓMEZ-PLAZA E; MIÑANO A; LÓPEZ-ROCA J. M. Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. **Food Chemistry**, v.97, p.87-94, 2006.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, F1.2.1–F1.2.13, 2001.

HARSHA P. S. C. S; GARDANA C; SIMONETTI P; SPIGNO G; LAVELLI V. Characterization of phenolics, in vitro reducing capacity and anti-glycation activity of red grape skins recovered from winemaking by-products. **Bioresource Technology**, v.140, p.263-268, 2013.

HOFFMANN R. ANÁLISE DE REGRESSÃO: Uma introdução à econometria. 4 ed. São Paulo: HUCITEC, 2006. 397p.

IGNAT I; VOLF I; POPA V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v.126, p.1821-1835, 2011.

JARA-PALACIOS M. J; HERNANZ D; CIFUENTES-GOMEZ T; ESCUDERO-GILETE M. L; HEREDIA F. J; SPENCER J. P. E. Assessment of white grape pomace from winemaking as source of bioactive compounds, and its antiproliferative activity. **Food Chemistry**, v.183, p.78-82, 2015.

KIRCA A; CEMEROGLU B. Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. **Food Chemistry**, v.81, p.583-587, 2003.

LI, Y.; HAN, L.; MA, R.; XU, X.; ZHAO, C.; WANG, Z.; CHEN, F.; HU, X. Effect of energy density and citric acid concentration on anthocyanins yield and solution temperature of grape peel in microwave-assisted extraction process. **Journal of Food Engineering**, v.109, p.274–280, 2012.

LIAZID A; GUERRERO R. F; CANTOS E; PALMA M; BARROSO C. G. Analytical Methods: Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. **Food Chemistry**, v.124, p.1238-1243, 2011.

LEES D. H.; FRANCIS, F. J. Standardization of pigment analyses in cranberries. **HortScience**, v.7, p.83-84, 1972.

LEE J.; DURST R. W.; WROLSTAD R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.88, p.1269-1278, 2005.

MORAIS D. R; ROTTA E. M; SARGI S. C; SCHMIDT E. M; BONAFE E. G; EBERLIN M. N; SAWAYA A. C. H. F; VISENTAINER J. V. Antioxidant activity, phenolics and UPLC-ESI(-)-MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. **Food Research International**, v.77, p.392-399, 2015.

MINJARES-FUENTES R; FEMENIA A; GARAU M. C; MEZA-VELÁZQUEZ J. A; SIMAL S; ROSSELLÓA C. Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: A response surface methodology approach. **Carbohydrate Polymers**, v.106, p.179–189, 2014.

MEIRELES. M. A. A. Extracting Bioactive Compounds for Food Products: Theory and Applications. London: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008. 464p.

MANTELL C; RODRÍGUEZ M; MARTÍNEZ DE LA OSSA E. Semi-batch extraction of anthocyanins from red grape pomace in packed beds: experimental results and process modelling. **Chemical Engineering Science**, v.57, p.3831-3838, 2002.

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, p.170-176, 2001.

McGUIRE R. Reporting of objective color measurements. **HortScience**, v.27, p.1254-1255, 1992.

NORMAN G. Likert scales, levels of measurement and the "laws" of statistics. **Advances in Health Sciences Education: Theory and Practice**, v.15, p.625–632, 2010.

O'SHEA N; ARENDT E. K; GALLAGHER E. Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.16, p.1-10, 2012.

PEDRO A. C.; GRANATO D.; ROSSO N. D. Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability. **Food Chemistry**, v.191, p.12-20, 2016.

POMPEU D. R; SILVA E.M; ROGEZ H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v.100, p.6076–6082, 2009.

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, p.2111–2117, 2005.

RIBEIRO L. F; RIBANI R. H; FRANCISCO T. M. G; SOARES A. A; PONTAROLO R; HAMINIUK C. W. I. Profile of bioactive compounds from grape pomace (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) by spectrophotometric, chromatographic and spectral analyses. **Journal of Chromatography B**, v.1007, p.72–80, 2015.

ROCKENBACH I. I; RODRIGUES E; GONZAGA L. V; CALIARI V; GENOVESE M. I; GONÇALVES A. E. 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, p.174–179, 2011.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; WROLSTAD, R. E. Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. In: WROLSTAD, R. E. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001. p. F1.1.1-F1.1.11.

SANG J; SANG J; MA Q; HOU X; LI C. Extraction optimization and identification of anthocyanins from *Nitraria tangutorun* Bobr. seed meal and establishment of a green analytical method of anthocyanins. **Food Chemistry**, v.218, p.386–395, 2017.

SINELA A; RAWAT N; MERTZ C; ACHIR N; FULCRAND H; DORNIER M. Anthocyanins degradation during storage of Hibiscus sabdariffa extract and evolution of its degradation products. **Food Chemistry**, v.214, p.234-241, 2017.

SILVA L. M. R; FIGUEIREDO E. A. T; RICARDO N. M. P. S; VIEIRA I. G. P; FIGUEIREDO R. W; BRASIL I. M; GOMES C. L. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v.143, p.398-404, 2014.

SUI X; DONG X; ZHOU W. Combined effect of pH and high temperature on the stability and antioxidant capacity of two anthocyanins in aqueous solution. **Food Chemistry**, v.163, p.163-170, 2014.

SHAPIRO S. S; WILK M. B. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). **Biometrika**, v.52, p.591-611, 1965.

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, p.397–406, 2015.

TEIXEIRA A; BAENAS N; DOMINGUEZ-PERLES R; BARROS A; ROSA E; MORENO D. A; GARCIA-VIGUERA C. Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, p.15638-15678. 2014.

VATAI T; ŠKERGET M; KNEZ Ž; KARETH S; WEHOWSKI M; WEIDNER E. Extraction and formulation of anthocyanin-concentrates from grape residues. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.45, p.32-36, 2008.

WANG W; JUNG J; TOMASINO E; ZHAO Y. Optimization of solvent and ultrasound-assisted extraction for different anthocyanin rich fruit and their effects on anthocyanin compositions. **LWT - Food Science and Technology**, v.72, p.229-238, 2016.

WETTASINGHE M; SHAHIDI F. Evening primrose meal: A source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.1801–1812, 1999.

YAMAMOTO L. Y; ASSIS A. M; ROBERTO S. R; BOVOLENTA Y. R; NIXDORF S. L; GARCÍA-ROMERO E; GÓMEZ-ALONSO S; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ I. Application of abscisic acid (S-ABA) to cv. Isabel grapes (*Vitis vinifera* × *Vitis labrusca*) for color improvement: Effects on color, phenolic composition and antioxidant capacity of their grape juice. **Food Research International**, v.77, p.572–583, 2015.

YANG L; CAO Y. L; JIANG J. G; LIN Q. S; CHEN J; ZHU L. Response surface optimization of ultrasound-assisted flavonoids extraction from the flower of *Citrus aurantium* L. var. amara Engl. **Journal of Separation Science**, v.33, p.1349–1355, 2010.