



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

Liana Stoll

**Desenvolvimento e aplicação de filmes biodegradáveis com antioxidantes
extraídos a partir de bagaço de uva, um resíduo da indústria vitivinícola**

Orientador: Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Hickmann Flôres

Porto Alegre, outubro de 2015

LIANA STOLL

Desenvolvimento e aplicação de filmes biodegradáveis com antioxidantes extraídos a partir de bagaço de uva, um resíduo da indústria vitivinícola

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como um dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Simone Hickmann Flôres

Porto Alegre, outubro de 2015

CIP - Catalogação na Publicação

Stoll, Liana
Desenvolvimento e aplicação de filmes
biodegradáveis com antioxidantes extraídos a partir
do bagaço de uva, um resíduo da indústria vitivinícola
/ Liana Stoll. -- 2015.
116 f.

Orientador: Alessandro de Oliveira Rios.
Coorientadora: Simone Hickmann Flôres.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Filmes biodegradáveis. 2. Antocianinas. 3.
Microcápsulas. 4. Antioxidantes. 5. Agentes
encapsulantes. I. Rios, Alessandro de Oliveira,
orient. II. Flôres, Simone Hickmann, coorient. III.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

Autor: Liana Stoll (Engenheira de Alimentos – UFRGS).

Título da dissertação: **Desenvolvimento e aplicação de filmes biodegradáveis com antioxidantes extraídos a partir de bagaço de uva, um resíduo da indústria vitivinícola**

Submetida como parte dos requisitos para a obtenção do grau de
MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Aprovada em:/...../.....

Homologada em:/...../.....

Pela Comissão Examinadora:

Por:

Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios
Orientador
Docente do Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos
PPGCTA/UFRGS

Prof^a. Dr^a. Rosane Rech
Coordenadora do PPGCTA

Prof^a. Dr^a. Simone Hickmann Flôres
Co-orientadora
Docente do Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos
PPGCTA/UFRGS

Prof. Dr. Vitor Manfroi
Diretor do ICT Alimentos
(PPGCTA)

Banca: Prof. Dr. Adriano Brandelli
Doutor em Ciências Químicas
PPGCTA/UFRGS

Banca: Prof^a. Dr^a. Ligia Damasceno F. Marczak
Doutora em Engenharia Mecânica - UFSC
DEQUI/UFRGS

Banca: Prof. Dr. Voltaire Sant'Anna
Doutor em Engenharia Química - UFRGS
Professor Adjunto UERGS

Porto Alegre, outubro de 2015

AGRADECIMENTOS

À minha amada e querida família, pelo apoio constante, pelo exemplo e acima de tudo, pelo amor.

Aos meus amigos, por me alegrarem, me compreenderem, e tornarem minha vida mais leve e divertida.

Aos meus colegas do Laboratório de Compostos Bioativos (Laboratório 211) pelo bom ambiente de trabalho, amizade e troca de conhecimentos.

Aos meus queridos e inseparáveis Edilsons, pela amizade, carinho e companheirismo que tornaram o período de mestrado muito mais prazeroso, cultural, engraçado e sobretudo, mais feliz!

Ao Alexandre, que foi imprescindível para que o trabalho acontecesse e não mediu esforços ao longo de todas as etapas, e ao Matheus, que me auxiliou na etapa inicial do trabalho, pela dedicação e empenho.

Aos meus queridos orientadores Alessandro e Simone, pelo diálogo aberto, receptividade, compreensão e confiança. Obrigada por me mostrarem o caminho da ciência e acreditarem no meu trabalho.

À professora Tania, pela ajuda e receptividade.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela infraestrutura oferecida

Agradeço, também, à CAPES pelo apoio financeiro.

“A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais o alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar.”

Eduardo Galeano

RESUMO

O consumo abusivo de embalagens plásticas tem causado diversos problemas ambientais, visto que as mesmas são produzidas a partir de fontes não renováveis de energia e são resistentes à degradação. Neste contexto, o desenvolvimento de filmes biodegradáveis ativos para aplicação em alimentos é de grande importância pois, além de serem produzidos a partir fontes renováveis e mais sustentáveis, os mesmos podem interagir com o produto embalado e proporcionar benefícios extras em relação aos filmes convencionais. Este trabalho utilizou o bagaço de uva proveniente do processo de vinificação como fonte de antocianinas para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis com propriedades antioxidantes. A microencapsulação das antocianinas, realizada com a finalidade de aumentar sua estabilidade, utilizou maltodextrina e goma arábica como agentes encapsulantes. Diferentes formulações de filmes biodegradáveis foram desenvolvidas com as microcápsulas produzidas. Goma arábica, maltodextrina e a combinação das mesmas foram eficientes no processo de microencapsulação (>90% de retenção de antocianinas). Apesar de apresentarem o mesmo teor de antocianinas - quantificadas via cromatografia líquida de alta eficiência - a atividade antioxidante das microcápsulas de goma arábica foi maior. A diferença entre a atividade antioxidante das cápsulas foi atribuída às diferentes solubilidades destas em água, onde maiores solubilidades poderiam liberar mais facilmente as antocianinas encapsuladas. O filme desenvolvido a partir de antocianinas encapsuladas com maltodextrina apresentou melhores propriedades mecânicas e ofereceu maior proteção ao óleo de girassol frente às reações de oxidação, e portanto foi utilizado na produção de sachês de azeite de oliva extra-virgem. O filme desenvolvido apresentou biodegradabilidade comprovada e propiciou maior estabilidade oxidativa ao azeite de oliva nele embalado quando comparado a um azeite embalado em polipropileno comercial. Os resultados obtidos neste trabalho comprovam a potencialidade da utilização de maltodextrina como encapsulante de antocianinas e como ingrediente na produção de filmes biodegradáveis, aplicados principalmente em produtos gordurosos.

Palavras-chave: embalagens biodegradáveis; antocianinas; microcápsulas; goma arábica; maltodextrina; azeite de oliva.

ABSTRACT

The abuse of plastic packaging has caused various environmental problems, since they are produced from non-renewable sources of energy and are resistant to degradation. In this context, the development of active biodegradable films for application in foods is of great importance, since they are produced from renewable and sustainable sources, besides they may interact with the packaged product and provide additional benefits over conventional films. This study used the wine grape pomace as a source of anthocyanins for the development of biodegradable films with antioxidant properties. Microencapsulation of anthocyanins, which was carried out with the purpose of increasing its stability, used maltodextrin and gum arabic as wall materials. Different formulations of biodegradable films were developed with the obtained microcapsules. Gum arabic, maltodextrin and their combination were effective in the microencapsulation process (> 90% retention of anthocyanins). Despite being provided with the same anthocyanins content - quantified by high-performance liquid chromatography - the antioxidant activity of gum arabic microcapsules was greater. The difference between the antioxidant activity of the capsules was attributed to their different solubility in water, so that capsules with higher solubility could release more easily the encapsulated anthocyanins. The film containing anthocyanins encapsulated with maltodextrin showed better mechanical properties and offered greater protection to sunflower oil against oxidation reactions, and so was used in the production of extra-virgin olive oil pouches. The developed film, which was proven to be biodegradable, increased the oxidative stability of the olive oil when compared to olive oil packaged in a commercial polypropylene. The results of this study demonstrate the potential usage of maltodextrin as wall material on encapsulation of anthocyanins and as an ingredient in the production of biodegradable films, mainly applied in fatty products.

Keywords: biodegradable packaging; anthocyanins; microcapsules; gum arabic; maltodextrin; olive oil

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Principais compostos fenólicos encontrados em uvas	26
Figura 2 - Extratos de grau alimentício obtidos a partir do bagaço de uva.....	38
Figura 3 - Processo de maceração das microcápsulas após a liofilização.....	39
Figura 4 - Microcápsulas produzidas. Da esquerda para direita: GA, MD e GA/MD.	39
Figura 5 - Parâmetro CIELab de cores.....	45
Figura 6 - Processo de remoção de bolhas: solução filmogênica sob agitação mecânica.....	46
Figura 7 - Processo de secagem dos filmes em estufa com circulação forçada de ar	47
Figura 8 - Análise das propriedades mecânicas dos filmes realizada em texturômetro.	48
Figura 9 - Amostra de filme biodegradável (2 cm x 3 cm) acondicionada sobre malha de alumínio.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Faixas de concentração, limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) das antocianinas quantificadas via HPLC.	42
Tabela 2 - Formulações das soluções filmogênicas dos filmes elaborados com: microcápsulas de goma Arábica (F.GA); microcápsulas de goma Arábica e maltodextrina (F.GA/MD); microcápsulas de maltodextrina (F.MD)	46
Tabela 3 - Formulações e características dos filmes biodegradáveis produzidos a partir de microcápsulas de maltodextrina (MD)	102

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	12
CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Embalagens biodegradáveis	14
2.2 Filmes biodegradáveis	15
2.2.1 Propriedades mecânicas	17
2.2.2 Permeabilidade e propriedades de barreira.....	18
2.3 Filmes biodegradáveis ativos	19
2.4 Resíduos industriais na produção de filmes biodegradáveis.....	20
2.5 Resíduos da vinificação	22
2.6 Compostos bioativos no bagaço de uva.....	24
2.7 Compostos fenólicos	25
2.7.1 Antocianinas	27
2.8 Extração de compostos bioativos no bagaço de uva	29
2.9 Microencapsulação de compostos bioativos	32
2.10 Utilização de filmes biodegradáveis no armazenamento de óleos e azeites.....	34
CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Caracterização do bagaço	37
3.2 Obtenção dos extratos antociânicos	37
3.3 Obtenção das microcápsulas	38
3.3.1 Caracterização das microcápsulas	40
3.4 Desenvolvimento dos filmes biodegradáveis	45
3.5 Caracterização dos filmes	47
3.5.1 Propriedades mecânicas	47
3.5.2 Permeabilidade ao Vapor d'água.....	48
3.5.3 Propriedades ópticas	49
3.5.4 Biodegradabilidade	49
3.5.5 Atividade antioxidante: proteção aos processos oxidativos de óleo de girassol.....	50
3.5.6 Análise da superfície de filmes e morfologia das microcápsulas.....	51
3.6 Aplicação dos filmes desenvolvidos: armazenamento de azeite de oliva extra-virgem	51

3.6.1	Manutenção da qualidade do azeite de oliva extra-virgem (EVOO) sob condições aceleradas de degradação.....	52
3.7	Análise estatística	54
	CAPÍTULO 4 – ARTIGOS CIENTÍFICOS	55
	ARTIGO 1	55
	ARTIGO 2	79
	CAPÍTULO 5 - DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	101
5	DISCUSSÃO GERAL.....	101
6	CONCLUSÕES	104
	REFERÊNCIAS.....	105

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Embalagens plásticas apresentam inúmeras qualidades, tais como durabilidade, resistência e versatilidade. Apesar de apresentarem excelentes propriedades mecânicas, estes materiais sintéticos são extremamente resistentes à degradação, o que faz com que seu uso extensivo esteja relacionado a problemas ambientais que vão desde a necessidade de grandes espaços para sua deposição, à contaminação de águas e morte de animais que acidentalmente os ingerem.

Neste contexto, o desenvolvimento de materiais biodegradáveis para a aplicação em embalagens é de grande interesse, visto que são produzidos a partir de fontes renováveis de energia e decompõem-se rapidamente, o que evita diversos problemas para a sociedade e para o meio ambiente.

Os filmes biodegradáveis, em geral, apresentam baixa espessura e são preparados a partir de materiais biológicos como proteínas, polissacarídeos, lipídios ou da combinação destes compostos. Quando utilizados com a função de embalar alimentos, os filmes biodegradáveis atuam como barreira a elementos externos e protegem o produto embalado de danos físicos e biológicos, aumentando sua vida útil (HENRIQUE, CEREDA, SARMENTO, 2008).

Ao considerar que o processo de oxidação é um dos grandes responsáveis pela deterioração dos alimentos, antioxidantes naturais têm sido incorporados aos filmes com o intuito de promover maior estabilidade à oxidação lipídica de produtos gordurosos, bem como o prolongar a vida de prateleira de produtos altamente perecíveis (FALGUERA et al., 2011; GOMEZ-ESTACA, 2014). A incorporação destes compostos permite a obtenção de filmes ativos, os quais não apenas mantêm a qualidade dos alimentos, como também interagem com o produto e proporcionam benefícios extras em relação aos filmes convencionais (DAINELLI et al., 2008).

O bagaço de uva, um subproduto do processo de vinificação, é rico em diversos compostos bioativos com comprovada atividade antioxidante, o que inclui considerável quantidade de antocianinas. Além da atividade corante e antioxidante, as antocianinas são conhecidas por apresentarem inúmeros benefícios à saúde, entretanto, são instáveis aos efeitos da luz, calor e oxigênio (YOUSUF et al., 2015).

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver, caracterizar e aplicar filmes biodegradáveis com propriedades antioxidantes, fornecidas pela incorporação de microcápsulas de antocianinas extraídas do bagaço de uva. Para tal, propôs-se: (1) extrair e microencapsular as antocianinas do bagaço de uva; (2) desenvolver filmes biodegradáveis ativos produzidos a partir das microcápsulas produzidas; e (3) realizar a aplicação dos filmes desenvolvidos na embalagem de alimentos. Dentro desse contexto, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- realizar a extração de antocianinas do bagaço de uva;
- realizar a microencapsulação das antocianinas extraídas com agentes encapsulantes com propriedades de formação de filme (goma arábica e maltodextrina) e avaliar a eficiência do processo de microencapsulação;
- caracterizar as microcápsulas produzidas quanto a sua composição antociânica, capacidade antioxidante, solubilidade, morfologia e estabilidade de cor;
- desenvolver filmes biodegradáveis ativos com as microcápsulas produzidas;
- caracterizar os filmes biodegradáveis quanto suas propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor d'água, solubilidade em água, espessura, conteúdo de umidade, opacidade, atividade antioxidante e biodegradabilidade;
- realizar a aplicação dos filmes desenvolvidos no armazenamento - em forma de sachês - de azeite de oliva;
- comparar os efeitos da aplicação dos filmes biodegradáveis à aplicação de filmes sintéticos nas características do azeite de oliva embalado.

Este trabalho está organizado na forma de capítulos. O **Capítulo 2** apresenta a fundamentação teórica dos assuntos abordados ao longo da presente dissertação. No **Capítulo 3** estão descritos os procedimentos empregados para a realização do trabalho, na forma de Material e Métodos. Os dois artigos produzidos a partir dos resultados obtidos estão apresentados no **Capítulo 4**, e o **Capítulo 5** compreende uma discussão geral do trabalho realizado, assim como as conclusões obtidas a partir do mesmo.

CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são apresentados alguns fundamentos teóricos que embasaram a pesquisa e é realizada uma revisão bibliográfica sobre os assuntos abordados ao longo da presente dissertação. A revisão compreende os conceitos de embalagens biodegradáveis, filmes ativos e sua caracterização, a utilização de resíduos agroindustriais na produção de filmes biodegradáveis, as características dos resíduos do processo de vinificação e dos compostos bioativos presentes no bagaço de uva, a extração e microencapsulação de compostos bioativos, bem como a aplicação de filmes biodegradáveis em azeites e óleos comestíveis.

2.1 Embalagens biodegradáveis

As embalagens desempenham múltiplas funções nos alimentos, de forma que podem prolongar sua vida de prateleira, oferecer proteção mecânica, evitar contaminações, facilitar o transporte e o armazenamento. Além disso, ainda permitem fracionar os alimentos em quantidades ideais para o consumo. Atualmente, a maioria das embalagens utilizadas é produzida a partir de polímeros sintéticos provenientes de fontes não renováveis de energia, como o petróleo (SIRACUSA et al., 2008). Polímeros de origem petroquímica são largamente utilizados em embalagens alimentícias, como por exemplo polipropileno, poliestireno, policloreto de vinila (PVC), tereftalato de etileno (PET), poliésteres, poliamidas e filmes poliolefinicos. Sua ampla utilização relaciona-se com suas vantagens em relação a outros materiais, pois são química e mecanicamente resistentes, leves, possuem propriedades de barreira ao oxigênio e a compostos aromáticos e podem ser termossoldados ou impressos, além de apresentarem baixo custo (THARANATHAN, 2003; ARORA, PADUA, 2009). Por outro lado, estes polímeros apresentam baixa permeabilidade ao vapor d'água e são considerados não biodegradáveis (THARANATHAN, 2003), de forma que permanecem praticamente intactos ao longo dos anos e acarretam em sérios problemas ecológicos e ambientais (DO SUL, COSTA, 2014).

A dificuldade de reciclagem da maioria das embalagens sintéticas disponíveis tem incentivado diversas pesquisas no sentido de incrementar e/ou desenvolver polímeros biodegradáveis com características que permitam a sua utilização em embalagens alimentícias (MALI, GROSSMANN, YAMASHITA, 2010). Assim, o interesse no desenvolvimento de materiais com caráter biodegradável tem se intensificado como política em diversos setores da sociedade. Por parte das indústrias, o interesse refere-se à elaboração de embalagens que tenham apelo ambiental e que ao mesmo tempo promovam uma maior vida de prateleira do produto com garantia de segurança alimentar, sendo que os consumidores também estão interessados nessa aquisição (DE JONG, et al., 2005; MARTINS CERQUEIRA, VICENTE, 2012).

A substituição dos materiais sintéticos convencionais está associada ao conceito de biodegradabilidade que goza de atributos como *eco-friendly* e *user-friendly*, principalmente quando suas matérias-primas derivam de resíduos agrícolas ou industriais, de forma a incentivar a reutilização de materiais e a sustentabilidade ambiental. Outra vantagem das embalagens biodegradáveis é que, após seu uso, sua degradabilidade permite com que sejam transformadas em fertilizantes/adubos, de forma a otimizar a produção agrícola de modo sustentável (THARANATHAN, 2003).

Polímeros naturais podem ser utilizados na produção de embalagens biodegradáveis, onde sua degradação resulta primariamente da ação de microorganismos, tais como bactérias, fungos e algas de ocorrência natural. A degradação de polissacarídeos, a qual inicia pela clivagem da cadeia polimérica (hidrólise/oxidação) e forma oligossacarídeos de menor peso molecular, é seguida de uma etapa conhecida como mineralização, que ocorre dentro das células, onde os fragmentos oligoméricos são convertidos em biomassa, minerais, água e gases como CO₂ e CH₄ (ROBERTSON, 2012).

2.2 Filmes Biodegradáveis

Os filmes biodegradáveis são filmes de baixa espessura (geralmente não maior que 0,25 mm) (ASTM, 1999), preparados a partir de materiais biológicos como proteínas, polissacarídeos, lipídios ou da combinação destes compostos. Podem

atuar como barreira a elementos externos e, conseqüentemente, proteger o produto embalado de danos físicos e biológicos, com aumento da vida útil (HENRIQUE, CEREDA, SARMENTO, 2008).

A finalidade do uso de filmes biodegradáveis depende de suas propriedades funcionais, como barreira à umidade, gases e solutos, solubilidade em água, propriedades óticas, características mecânicas, reológicas e propriedades térmicas. Estas propriedades dependem da composição da matriz polimérica, do seu processo de obtenção, modo de aplicação, do condicionamento e da espessura do filme (ROBERTSON, 2012).

Em alimentos, os filmes podem ser comestíveis ou não, e podem atuar como cobertura (revestimento) (SOBRAL, 2000); são utilizados em produtos alimentícios com a finalidade de proteção, para inibir ou minimizar a permeação de umidade, o transporte de gases (O₂, CO₂, etileno), aromas e a migração de lipídios, além de também carregar aditivos alimentícios, antioxidantes e compostos antimicrobianos (DAINELLI et al., 2008; GOMEZ-ESTACA et al., 2014).

Os filmes biodegradáveis podem ser divididos em três categorias: hidrocoloides (amido, proteínas, celulose, alginatos, pectinas e outros polissacarídeos), lipídicos (ceras, acilglicerois e ácidos graxos) e compostos (hidrocoloides combinados a lipídicos) (PETERSSON, STADING, 2005).

De acordo com sua composição, os filmes biodegradáveis podem atuar de diversas maneiras sobre os alimentos; é possível desenvolver filmes biodegradáveis com características desejáveis para cada tipo de aplicação, uma vez que diferentes matrizes alimentícias demandam embalagens com funcionalidades distintas (FALGUERA et al., 2011). Em frutas e vegetais minimamente processados, por exemplo, é de interesse que a embalagem ofereça barreiras ao vapor d'água, a fim de evitar uma possível desidratação dos produtos (OLIVAS et al., 2003). Já para alimentos ricos em gordura, como peixes, carnes e queijos, os filmes biodegradáveis ideais são aqueles com características que previnem a oxidação lipídica e a perda de umidade (GENNADIOS, HANNA, KURTH, 1997).

Com o intuito de modificar benéficamente suas propriedades mecânicas, sensoriais, nutricionais ou de proteção, agentes plastificantes podem ser incorporados aos filmes. O material plastificante reduz as forças intermoleculares, suaviza a rigidez estrutural do filme e aumenta a mobilidade entre as cadeias

biopoliméricas, o que resulta em filmes com maior elasticidade e flexibilidade. Entretanto, podem tornar os filmes mais frágeis (VEIGA-SANTOS et al., 2005; THARANATHAN, 2003).

Em matrizes com base de amido, por exemplo, é comum o uso de polióis, como o glicerol e o sorbitol, que são materiais que interagem com as cadeias de amido através de ligações de hidrogênio, o que propicia uma melhoria nas suas propriedades mecânicas (MALI, GROSSMANN, YAMASHITA, 2010). Apesar dos plastificantes serem bons aditivos para os filmes de amido, pois melhoram a flexibilidade do filme e facilitam seu manuseio, a sua utilização pode prejudicar as propriedades de barreira, como permeabilidade aos vapores de água e solubilidade (SOUZA et al., 2011).

2.2.1 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes biodegradáveis são características determinantes para a sua utilização como material de embalagem. Estas compreendem a totalidade das propriedades que determinam a resposta dos materiais às influências mecânicas externas. As propriedades mecânicas são manifestadas pela capacidade dos materiais desenvolverem deformações reversíveis e irreversíveis, e resistirem à fratura (SOUZA et al., 2011)

As propriedades mecânicas mais frequentemente avaliadas em filmes são a resistência à tração e a porcentagem de alongação. A primeira é expressa pela tração máxima desenvolvida pelo filme no teste e a segunda refere-se à habilidade do filme em se estender. Os filmes obtidos devem ser resistentes à ruptura e à abrasão, além de oferecer proteção durante o manuseio e o transporte; também devem possuir flexibilidade suficiente para adaptar-se a eventuais deformações no alimento sem dano mecânico (MALI et al., 2004). As propriedades mecânicas de embalagens biodegradáveis dependem da composição química de polímeros, da compatibilidade entre os polímeros e aditivos e parâmetros de processamento do material (GONTARD; GUILBERT, 1996).

A magnitude da resistência à tração e da alongação está altamente associada à quantidade do agente plastificante presente no filme. Geralmente, o aumento da quantidade de plastificante resulta em filmes com menor resistência à tração e maior

elongação (VANIN et al., 2005), o que poderia ser explicado pela redução das forças intermoleculares e aumento da mobilidade das cadeias dos polímeros causados pela presença dos plastificantes (MALI et al., 2005).

2.2.2 Permeabilidade e propriedades de barreira

A fim de garantir a aparência, textura, aroma, qualidade nutricional e segurança dos alimentos, a permeabilidade do biofilme é um fator de extrema importância (FALGUERA et al., 2011). Em produtos embalados, cuja deterioração física ou química está relacionada ao seu contato com o O₂ ou com o equilíbrio de umidade com o ambiente, a permeabilidade a gases e ao vapor de água é fator determinante para a manutenção ou extensão da vida útil dos produtos (MANGARAJ, GOSWAMI, MAHAJAN, 2009; SIRACUSA et al., 2008; WANG et al., 2015).

Quando a matriz polimérica é composta por componentes de caráter hidrofílico (amido, glicerol, sorbitol), a avaliação da permeabilidade ao vapor de água é uma análise essencial, já que para muitos produtos o aumento no teor de umidade pode limitar o seu tempo de vida útil. Um material muito permeável ao vapor de água poderá ser indicado para embalagens de vegetais frescos, enquanto um filme pouco permeável poderá ser indicado para produtos desidratados (SIRACUSA et al., 2008; DUKALSKA et al., 2008).

Filmes biodegradáveis frequentemente apresentam maior permeabilidade ao vapor d'água quando comparados a filmes convencionais como o polipropileno, mas tendem a possuir baixa permeabilidade a CO₂ e O₂ (MISTRITIS et al., 2011). Um alimento embalado em um filme com baixo coeficiente de permeabilidade ao O₂ tende a ter um tempo de prateleira estendido (SIRACUSA et al., 2008). No entanto, uma baixa concentração de O₂ pode levar a uma relação CO₂/O₂ muito elevada, resultar em injúrias metabólicas e formação de sabores e odores desagradáveis desencadeados pela anaerobiose (YAMASHITA et al., 2005).

A permeabilidade ao oxigênio é altamente dependente da temperatura e da umidade relativa do ambiente. Estudos mostram que altas temperaturas podem aumentar a permeabilidade dos filmes em decorrência da expansão dos materiais poliméricos (HONG, KROCHTA, 2006). Já em relação à umidade relativa, quando

esta aumenta, mais moléculas de água interagem com o material de forma a aumentar a transferência de massa e a permeabilidade do filme (BONILLA et al., 2010).

A permeabilidade de filmes apresenta forte relação com sua composição, e filmes de base lipídica (ceras e ácidos graxos) geralmente possuem melhores propriedades de barreira a vapor d'água que filmes de base hidrocoloide. Por outro lado, hidrocoloides têm maior capacidade de controlar a migração de compostos lipídicos, gases e compostos aromáticos que os filmes biodegradáveis lipídicos (THARANATAN, 2003). Quanto à permeabilidade ao oxigênio, filmes produzidos a partir de polissacarídeos e proteínas oferecem excelente barreira, devido ao empacotamento das moléculas formando uma rede estrutural ordenada através de ligações de hidrogênio (BONILLA et al., 2010).

2.3 Filmes biodegradáveis ativos

Novas linhas de pesquisa têm surgido nas últimas décadas com o objetivo de desenvolver embalagens que não apenas mantenham a qualidade dos alimentos, mas também possam melhorar algumas de suas propriedades. Os chamados filmes biodegradáveis ativos interagem com o produto e proporcionam benefícios extras em relação aos filmes convencionais (DAINELLI et al., 2008; BODAGHI et al., 2013).

Diversos antioxidantes naturais como terpenos, tocoferóis, carotenoides e vitaminas têm sido utilizados em filmes biodegradáveis com o intuito de promover maior estabilidade em relação à oxidação lipídica dos produtos gordurosos (FALGUERA et al., 2011; GOMEZ-ESTACA et al., 2014).

A oxidação lipídica e o crescimento microbiano são os principais fatores de degradação de muitos alimentos, tais como carnes, peixes, leite em pó integral, molhos e outros produtos gordurosos, o que causa perdas de qualidade sensorial e nutricional. Uma das maneiras de retardar as reações de oxidação lipídica em alimentos é através da adição de compostos antioxidantes em embalagens. As embalagens ativas podem promover a liberação gradual de antioxidantes durante o período de armazenamento, de forma a prolongar a vida de prateleira dos produtos embalados (GOMEZ-ESTACA et al., 2014; JÚNIOR et al., 2015).

Uma das maneiras de realizar a incorporação destes compostos ao filme é através de sua adição direta, ou da utilização de micro ou nanocápsulas de compostos bioativos, que inibem ou retardam reações de oxidação ao interagirem com radicais livres e peróxidos (SOUZA et al., 2011, ASSIS et al., 2012). Outra possibilidade é a adição de nanopartículas metálicas com propriedades antimicrobianas capazes de retardar a proliferação de microrganismos patogênicos ou deteriorantes (RHIM, WANG, HONG, 2013). Precusores de aroma também podem ser incorporados em revestimentos para aumentar a percepção do sabor (OLIVAS et al., 2003).

Muitas dessas embalagens ativas têm sido desenvolvidas a partir de matérias-primas naturais e renováveis, de forma que tanto a matriz polimérica quanto os aditivos funcionais a ela incorporados apresentam caráter da biodegradabilidade (SANTANA et al., 2013).

2.4 Resíduos industriais na produção de filmes biodegradáveis

A grande quantidade de resíduos gerados pela indústria de alimentos não somente representa o desperdício de matérias-primas, como também implica em problemas de gerenciamento financeiro e ambiental. Ao considerar o alto potencial de reaproveitamento destes resíduos em outros sistemas, muitos estudos apontam alternativas para o destino destes materiais (MIRABELLA, CASTELLANI, SALLA, 2014).

Segundo Laufenberg (2003) alguns resíduos podem conter muitas substâncias de alto valor. Se tecnologias adequadas forem empregadas, estes materiais podem ser convertidos em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários, sendo que numerosas substâncias relacionadas ao processo de produção de alimentos são adequadas para separação e reciclagem. Dentro desta perspectiva, a produção de filmes biodegradáveis a partir de resíduos da agroindústria tem sido tema de diversos estudos (JOHANSSON et al., 2012)

Kayserilioğlu e colaboradores (2003) testaram a xilana, um resíduo agroindustrial presente na palha de trigo, talo e espiga de milho, sorgo e cana de açúcar, em associação ao glúten de trigo no desenvolvimento de filmes biodegradáveis; foram avaliados diferentes tipos e concentrações de xilana (0-40%

m/m), com variação das condições de secagem (controladas e não controladas) e pH (4 e 10); foi possível obter filmes com até 40% de xilana sem redução das propriedades formadoras de filme, onde a permeabilidade ao vapor d'água não foi alterada pela presença do carboidrato (KAYSERILIOĞLU et al., 2003).

Em trabalho realizado por Kang e Min (2010) foram desenvolvidos filmes biodegradáveis a partir de casca de batata, um resíduo industrial rico em polissacarídeos. Após as etapas de secagem e trituração, a fim de reduzir o tamanho das partículas e tornar possível a formação de um biofilme uniforme, o estudo utilizou tratamentos de despolimerização (homogeneização de alta pressão, irradiações gama e ultrassom); foram testadas diferentes concentrações farinha de casca de batata, glicerol (plastificante) e lecitina de soja (emulsificante), onde o aumento das concentrações de glicerol e lecitina de soja provocou redução na resistência a tração e módulo de elasticidade, e aumento na elongação de ruptura. A permeabilidade ao vapor d'água foi maior para maiores concentrações de glicerol.

Bagaço de cevada proveniente da indústria cervejeira foi utilizada por Bukzem, Santos e Ascheri (2012) para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis. Foram estudadas diferentes proporções de bagaço de cevada/fécula de mandioca (10:90 e 20:80) e utilizado glicerol como agente plastificante. O estudo resultou em filmes com alta solubilidade em água, onde a maior concentração de bagaço de cevada gerou filmes com superfícies heterogêneas, mais solúveis, menos hidrofílicos, mais resistentes à ruptura e com menor alongamento.

Garrido e colaboradores (2014) utilizaram proteína isolada de soja, derivada de resíduos da indústria de óleo, para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis, sendo avaliadas diferentes concentrações de sorbitol (30-50%) e pH (7 e 10). O estudo resultou na obtenção de filmes transparentes, hidrofóbicos e com excelentes propriedades de barreira a raios UV. Os filmes com maior percentual de sorbitol apresentaram menor resistência a tração e mais resistência a ruptura.

Um estudo realizado por Shi e Dumont (2014) desenvolveu filmes biodegradáveis a partir de proteína isolada de canola (PIC), um sub-produto da indústria de óleo. O filme foi produzido a partir de uma composição de PIC, glicerol (plastificante), lauril sulfato de sódio (desnaturante protéico) e ácido esteárico (co-plastificante). As propriedades mecânicas, térmicas e morfológicas do filme foram

avaliadas e a adição do agente desnaturante melhorou as propriedades mecânicas do filme.

Yoshida e Antunes (2009) observaram que filmes protéicos de soro de leite apresentam características de permeabilidade ao vapor d'água e gases e propriedades mecânicas com grande potencial para aplicação como embalagens.

Deng e colaboradores (2011) desenvolveram filmes biodegradáveis a base de extratos de bagaço de uvas provenientes do processo de vinificação. Através do desenvolvimento de diferentes formulações de filmes, que além dos extratos de uva continham pectina, polissacarídeos, alginato e/ou uma mistura comercial de polissacarídeos, o estudo demonstra a possibilidade de obter filmes com atividade antimicrobiana, antioxidante e com boas propriedades mecânicas a partir de resíduos vitivinícolas.

2.5 Resíduos da vinificação

O Brasil ocupa a 12^a posição na produção mundial de uva, com 1.514.700 toneladas produzidas no ano de 2012 (FAO, 2012). Com cerca de 32 mil hectares de vinhedos, a Serra Gaúcha, localizada na região Nordeste do Estado do Rio Grande do Sul, é a maior região vitícola do Brasil (PROTAS, CAMARGO, 2011; IBRAVIN 2014). Na safra 2012/2013, o Rio Grande do Sul produziu mais de 600 mil toneladas de uvas, as quais foram destinadas principalmente para produção de sucos, vinhos e consumo in natura (IBRAVIN, 2014).

Na última safra, o Rio Grande do Sul obteve uma produção de aproximadamente 370 mil litros de vinho (IBRAVIN, 2014), com um rendimento médio no processo de transformação da uva em vinho de 65% (MENEGUZZO, MANFROI, RIZZON, 2006), o que gerou 200 mil toneladas de resíduos nas vinícolas em 2013.

A transformação de uva em vinho produz resíduos sólidos (bagaço, sementes, engaços, borras, resíduos de filtração e destartarização) e resíduos líquidos resultantes de lavagens na vinícola, os quais, quando possível, devem ter tratamento diferenciado (PIRRA, 2005; NERANTZIS, TATARIDIS, 2006).

Atualmente, apenas uma pequena fração do resíduo produzido pelas vinícolas é utilizado na fabricação de destilados (grapa), enquanto que sua grande maioria é tratada como resíduo de baixo valor, sendo utilizada como adubo orgânico e ração animal (CAMPOS et al., 2008). Entretanto, estudos demonstram que seu uso como adubo pode acarretar em problemas no desenvolvimento de plantas, onde a presença de compostos fenólicos do bagaço de uva acaba por inibir certos processos germinativos. Além disso, quando utilizado como ração animal, o alto teor de lignina presente nesse resíduo dificulta o processo de digestão de ruminantes, visto que a lignina inibe a atuação de enzimas celulósicas e proteolíticas, assim como o desenvolvimento de algumas bactérias do rúmen (ABARGHUEI, ROUZBEHAN, ALIPOUR, 2010; FONTANA, ANTONIOLLI, BOTTINI, 2013).

O bagaço (constituído por casca e restos de polpa) e as sementes de uva contêm grande variedade de moléculas biológicas ativas, como polifenóis antioxidantes, por exemplo. Esta riqueza fenólica torna este resíduo uma potencial fonte de compostos antioxidantes para aplicação nas indústrias farmacêutica e de alimentos (BUCIĆ-KOJIĆ et al., 2007; YU, AHMEDNA, 2013). Contudo, a falta de informação técnica apropriada para a extração destes compostos ainda é um fator que dificulta a utilização destes resíduos como fonte de compostos bioativos (WIJNGAARD et al., 2012).

As sementes, que representam de 20 a 26 % do grão, são compostas por aproximadamente 60 a 70 % de carboidratos não digeríveis, 13 a 19 % de óleo e 11 % de proteínas, além de possuir compostos fenólicos complexos como taninos, minerais e outras substâncias (CAMPOS et al. 2008; YU, AHMEDNA, 2013). O óleo presente nas sementes é rico em vitamina E e ácidos graxos insaturados, como o ômega-6 e ômega-9, substâncias que desenvolvem papel importante na saúde humana (MAIER et al., 2009). Além disso, a semente é uma boa fonte de compostos antioxidantes, tais como monômeros de flavan-3-ol (catequinas), ácidos fenólicos, proantocianidinas oligoméricas e resveratrol (NEGRO, TOMMASI, MICELI, 2007; PRASAIN et al., 2009; YU, AHMEDNA, 2013).

Embora algumas indústrias já utilizem a semente de uva como fonte de óleo para utilização farmacêutica e alimentar, o bagaço proveniente do processo de vinificação ainda é pouco explorado. Visto que as etapas de fermentação e maceração não promovem a extração completa dos compostos fenólicos, uma

grande quantidade destes compostos permanece no bagaço de uvas tintas (LAFKA, SINANOGLU, LAZOS, 2007; NEGRO, TOMMASI, MICELI, 2007).

As cascas representam em média 82% do bagaço de uva (peso úmido) após a etapa de prensagem do processo de vinificação (JIANG, SIMONSEN, ZHAO, 2011). Estudos avaliaram a composição centesimal das mesmas e obtiveram valores próximos a 55% de fibras, 12% de proteínas, 6% de lipídios, 7% de cinzas e 2% de açúcares solúveis (DENG, PENNER, ZHAO, 2011; BAUMGÄRTEL et al., 2007).

Da quantidade de fibras presente na casca, quase 95% são consideradas insolúveis, onde as principais fibras encontradas são pectina, celulose e lignina. A proporção destas pode variar muito e depende do cultivar estudado, entre outros fatores (DENG, PENNER, ZHAO, 2011). No estudo de Deng e colaboradores (2011), que comparou diferentes uvas tintas e brancas, foi verificado que as uvas brancas possuem quantidades significativamente inferiores de fibras quando comparadas a uvas tintas.

A casca de uvas tintas é bastante conhecida por sua riqueza em compostos fenólicos como antocianinas, catequinas, ácidos hidrocínâmicos e flavonóis. Estes compostos possuem comprovada atividade antioxidante, além de inibirem a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (YILDIRIM et al., 2005; YOUSUF et al., 2015).

2.6 Compostos bioativos no bagaço de uva

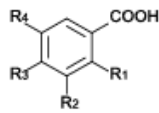
Compostos bioativos podem ser definidos, na natureza, como metabólitos secundários de plantas que possuem efeitos farmacológicos ou toxicológicos em homens e animais (BERNHOF, 2010). Esses compostos variam extensamente em estrutura química e, conseqüentemente, em suas funções biológicas. Entretanto, apresentam algumas características em comum: pertencem a plantas do reino vegetal, são substâncias orgânicas, geralmente apresentam baixo peso molecular, não são indispensáveis nem sintetizados pelo organismo humano e apresentam ação protetora na saúde humana quando presentes na dieta em quantidades significativas (HORST, LAJOLO, 2007).

Devido aos numerosos efeitos biológicos que exercem, os compostos bioativos têm recebido muita atenção da comunidade científica. Como exemplo tem-se os benefícios trazidos pela ingestão de compostos fenólicos através do consumo de vinhos. Estudos comprovam o efeito positivo do consumo de vinhos tintos no aumento da capacidade antioxidante do plasma, atividade fibrinolítica e antitrombina. Além disso, o consumo moderado de vinho (125 mL a 250 mL/dia) poderia causar redução no estresse oxidativo de células, na agregação de plaquetas e redução de riscos cardiovasculares. Estes benefícios se devem a presença de compostos bioativos provenientes da casca e sementes da uva, mais especificamente, aos compostos fenólicos neles contidos (FERNÁNDEZ-MAR et al., 2012).

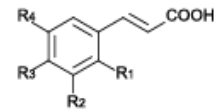
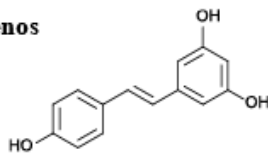
O bagaço de uva proveniente do processo de vinificação é rico em diversos compostos bioativos, incluindo antocianinas, flavonóis, flavanóis, resveratrol e ácidos fenólicos, os quais possuem comprovada atividade antioxidante, além de apresentarem atividade cardioprotetora (IACOPINI et al, 2008; XIA et al., 2010; MELO et al., 2015).

2.7 Compostos fenólicos

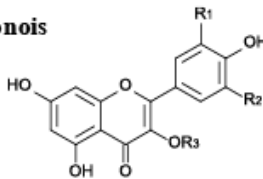
Os compostos fenólicos representam a maior parte dos compostos bioativos no bagaço de uva e constituem um dos maiores e mais amplos grupos químicos presentes no reino vegetal. Quimicamente, são definidos como substâncias dotadas de anel aromático, com um ou mais grupos hidroxilados, o que inclui seus derivados funcionais (NACZK, SHAHIDI, 2004). Os fenólicos apresentam não somente uma variedade de moléculas com estrutura polifenólica (com mais de um grupo hidroxilado e vários anéis aromáticos), mas também moléculas com apenas um único anel aromático, como os ácidos e alcoóis fenólicos (FONTANA, ANTONIOLLI, BOTTINI, 2013). A Figura 1 apresenta as estruturas moleculares dos principais fenólicos encontrados em uvas.

Figura 1 - Principais compostos fenólicos encontrados em uvas**Ácidos Hidroxibenzoicos**

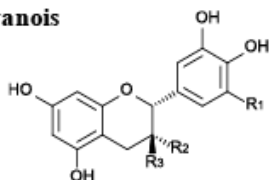
	R1	R2	R3	R4	
ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	H	H	OH	H	ácido <i>p</i> -cumárico
ácido protocatecuico	H	OH	OH	H	ácido caféico
ácido vanílico	H	OCH ₃	OH	H	ácido ferúlico
ácido gálico	H	OH	OH	OH	
ácido siríngico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	ácido sinápico

Ácido Hidrocinâmicos**Estibenos**

Trans-resveratrol

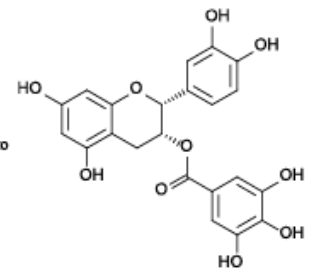
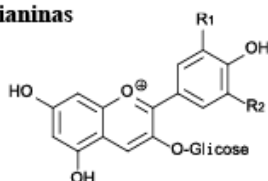
Flavanois

	R1	R2	R3
campferol	H	H	H
quercetol	OH	H	H
miricetol	OH	OH	H
isorhamnetol	OCH ₃	H	H

Flavanois

	R1	R2	R3
(+)-catequina	H	H	OH
(-)-epicatequina	H	OH	H
(+)-galocatequina	OH	H	OH
(-)-epigalocatequina	OH	OH	H

(-)-epicatequina-3-O galato

**Antocianinas**

	R1	R2
cianidina-3-O-glicosídeo	OH	H
delfinidina-3-O-glicosídeo	OH	OH
paeonidina-3-O-glicosídeo	OCH ₃	H
petunidina-3-O-glicosídeo	OCH ₃	OH
malvidina-3-O-glicosídeo	OCH ₃	OCH ₃

Fonte: Lorrain et al., 2013

Entre os possíveis efeitos causados pela presença de compostos fenólicos em alguns sistemas (alimentos, medicamentos e cosméticos) cita-se o sequestro de espécies radicais de oxigênio, a modulação da atividade de algumas enzimas específicas, a inibição da proliferação celular, bem como seu potencial como agente antibiótico, antialérgico e antiinflamatório (MANACH et al., 2004; FONTANA, ANTONIOLLI, BOTTINI, 2013).

A composição fenólica do bagaço de uva, assim como suas propriedades biológicas e funcionais, foi estudada por alguns pesquisadores. Os estudos revelam, entre outros benefícios, o potencial antioxidante destes compostos (RUBERTO et al., 2007; YU, AHMEDNA, 2013), onde é encontrada uma relação direta entre a concentração de fenólicos totais e a capacidade antioxidante dos extratos de uva

(YANG, MARTINSON, LIU, 2009). Esta característica antioxidante demonstra não apenas o benefício à saúde de quem os consome, mas também a possibilidade de preservação de alimentos, visto que, quando adicionados a formulações de produtos alimentícios, os compostos fenólicos podem prevenir reações de oxi-redução, aumentando a vida de prateleira dos produtos (GOMEZ-ESTACA et al., 2014).

Através da observação dos diversos estudos existentes, pode-se intuir que as concentrações de compostos fenólicos, assim como as proporções encontradas em cada parte da uva, varia de acordo com a localização geográfica, grau de maturação, cultivar, técnicas de manejo e condições do processo de vinificação a que o bagaço que foi submetido (RUBERTO et al., 2007). Além disso, estudos mostram que as condições do processo de extração dos compostos têm forte influência nos resultados obtidos, de modo que o tipo de solvente, temperatura e pH utilizados são fatores de grande importância (DENG, PENNER, ZHAO, 2011).

Os compostos fenólicos presentes no bagaço de uva podem ser classificados em dois grandes grupos: flavonoides e não flavonoides. Os flavonoides incluem os flavanois (catequina, epicatequina), flavonois (quercetina, campferol) e antocianinas. Os não flavonoides consistem nos hidrobencênicos (ácido gálico), hidroxicinamatos e estilbenos (MITIĆ et al., 2012).

2.7.1 Antocianinas

Antocianinas são responsáveis pela coloração das uvas e constituem uma das principais classes de pigmentos vegetais. Consideradas como possíveis substitutos de corantes sintéticos, as antocianinas são hidrossolúveis e apresentam uma ampla faixa de cores, que varia do vermelho alaranjado ao roxo, passando pelo vermelho vivo e representam assim, grande interesse para a indústria cosmética e de alimentos. Sua coloração está intimamente ligada ao pH do meio em que se encontram, o que dificulta a padronização destas substâncias (TERCI, ROSSI, 2002; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; MITIĆ et al., 2012).

Quimicamente, antocianinas são heterosídeos formados pela combinação de uma aglicona (antocianidina) e de um açúcar, geralmente a glicose (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009). As antocianinas presentes na uva são monoglicosídeos de cinco antocianidinas, denominadas delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina e

malvidina, as quais diferem entre si quanto ao número de hidroxilas e ao grau de metoxilação do cátion flavílium (MITIĆ et al., 2012; TANAKA, SASAKI, OHMNYA, 2008). As antocianinas são modificadas pelos grupos glicosilados e acilados, para originar centenas de diferentes moléculas que diferem entre si principalmente quanto à cromaticidade e estabilidade (TANAKA, SASAKI, OHMYA, 2008).

A estabilidade das antocianinas possui forte relação com as cadeias laterais ligadas à estrutura básica do cátion flavílium. Com base no grau de metilação das moléculas, a malvidina representa a mais estável das antocianidinas, visto que possui dois radicais metilados. Além disso, átomos de hidrogênio ligados à cadeia lateral conferem mediana estabilidade às antocianinas, e o radical hidroxil é o que confere ao pigmento maior suscetibilidade aos processos de degradação (TANAKA, SASAKI e OHMYA, 2008).

As antocianinas, assim como a maioria dos flavonoides, são antioxidantes naturais e reduzem danos causados pela presença de radicais livres em diversos sistemas (VAN ACKER *et al.*, 1996). A presença de radicais livres pode levar à oxidação das antocianinas, o que resulta em radicais menos reativos e mais estáveis. Em outras palavras, as antocianinas estabilizam as espécies reativas de oxigênio (TSUDA *et al.*, 1996; KUSKOSKI *et al.*, 2004; YOUSUF et al., 2015).

Fraige e colaboradores (2014) avaliaram o perfil antociânico de 11 variedades de uvas de diferentes origens geográficas, e encontraram variação na composição das mesmas. Porém, todos os cultivares apresentaram malvidina-3-O-glicosídeo como o composto antociânico majoritário, o que representa mais de 32% das antocianinas presentes nas uvas *Vitis vinifera*. O mesmo foi observado em outros estudos, que verificaram uma maior concentração de malvidina, seguido por peonidina, petunidina, delphinidina e cianidina em uvas (ABE et al., 2007; CHIOU et al., 2014; KALLITHRAKA et al., 2005). Pelargonidina é relatada como o composto antociânico menos prevalente em uvas *Vitis vinifera*, estando muitas vezes presente apenas em quantidades traço (HE et al., 2010)

É comum que a quantificação de antocianinas totais seja mais elevada que a soma de antocianinas individuais (malvidina, peonidina, petunidia, delphiidina e cianidina), o que indica a presença de outros compostos não identificados, como algumas antocianinas acetiladas, por exemplo (CHIOU et al., 2014; HE et al., 2010).

Em relação ao potencial antioxidante de compostos antociânicos, Kuskoski e colaboradores (2004) avaliaram a capacidade antioxidante de cinco antocianinas: delphinidina, cianidina, peonidina, pelargonidina e malvidina, todas glicosiladas, com exceção da delphinidina. Das antocianinas estudadas, a delphinidina e cianidina 3-glicosídeo apresentaram maior atividade antioxidante, medida pelo método ABTS.

Estudos avaliam que a capacidade antioxidante das antocianinas está relacionada ao grau de hidroxilação, onde a substituição das hidroxilas por unidades glicosídicas reduz seu potencial antioxidante, fazendo com que as formas agliconas sejam antioxidantes mais eficientes quando comparados a sua forma glicosilada. O alto poder de reação do grupo hidroxil das antocianinas com radicais livres representa a importância dos grupos hidroxilas para a elevada capacidade antioxidante das antocianinas, o que pode ser observado no efeito causado por delphinidinas e cianidinas, as antocianinas com maior poder antioxidante (WANG, CAO, PRIOR, 1997; KUSKOSKI, 2004).

Embora a capacidade antioxidante de antocianinas seja reconhecida por diversos estudos, não há uma relação direta entre a quantidade de antocianinas totais e a sua capacidade antioxidante; tal fato pode ser explicado pela possível sinergia existente entre compostos, assim como o efeito adicional de diferentes antocianinas, o que pode promover maior ou menor ação antioxidante. A capacidade antioxidante é dependente da proporção de compostos antociânicos e fenólicos, e não de sua totalidade (YANG, MARTINSON, LIU, 2009)

2.8 Extração de compostos bioativos no bagaço de uva

O bagaço de uva proveniente do processo de vinificação, embora rico em diversos compostos fenólicos, é tratado como resíduo de baixo valor, de forma a representar uma fonte interessante e barata de fitoquímicos para uso em alimentos, fármacos e indústria cosmética (SANT'ANNA et al., 2012; FONTANA, ANTONIOLLI, BOTTINI, 2013).

Devido ao crescente interesse na realização de práticas sustentáveis, a obtenção de fitoquímicos a partir de resíduos agroindustriais tem ganhado força e estimulado diversos estudos que visem à otimização da extração destes compostos, em quantidade e qualidade (FONTANA, ANTONIOLLI, BOTTINI, 2013). Nesse

contexto, pesquisadores têm avaliado diferentes sistemas solventes, temperaturas, proporções extrato/solvente, entre outros parâmetros, com a intenção de extrair ao máximo os compostos fenólicos presentes no bagaço (SPIGNO, TRAMELLI, DE FAVERI, 2007; PINELO, ARNOUS, MEYER, 2006; MANÉ et al., 2007). A escolha das técnicas de extração de componentes bioativos a partir de resíduos da vitivinicultura é um fator de extrema importância, que vai depender, sobretudo do tipo de aplicação a qual será destinado o extrato (GRUZ et al., 2013). Para a obtenção de extratos para fins alimentícios, compostos tóxicos devem ser evitados.

Diversos estudos afirmam a importância de realizar a trituração do bagaço, como preparo prévio, a fim de reduzir o tamanho das partículas e aumentar a superfície de troca mássica e conseqüentemente, o rendimento da extração. Além disso, a trituração promove o rompimento da parede celular das células vegetais, o que permite uma maior liberação dos compostos (SPIGNO, TRAMELLI, DE FAVERI, 2007).

O rompimento da parede celular através da trituração pode ser otimizado pelo uso de enzimas como celulase, hemicelulase e pectina, que hidrolisam as ligações polissacarídicas e aceleram o processo de extração (PINELO, ARNOUS, MEYER, 2006).

A escolha do solvente adequado é um fator que merece atenção. Diversos tipos e proporções de solvente têm sido estudados para a extração de fenólicos em uvas, onde a maior parte dos estudos demonstra que misturas de álcool e água são mais eficientes que sistemas de extração mono-componentes (YILMAZ, TOLEDO, 2006). A temperatura de extração deve ser escolhida com cuidado, a fim de propiciar maiores coeficientes de difusão, porém sem causar a degradação dos compostos de interesse. Outro fator importante é o pH do meio, onde a extração de compostos fenólicos é maximizada em pH's mais baixos, o que justifica a adição de ácidos nos processos extrativos de diversos estudos (LORRAIN et al., 2013).

Diferentes sistemas solventes foram aplicados para determinar a eficiência de extração de compostos bioativos em bagaço de uva proveniente do processo de vinificação no estudo de Rockenbach e colaboradores (2008). O estudo concluiu que o solvente etanol (50% e 70%) foi mais efetivo na extração de antocianinas, enquanto que acetona (50% e 70%) foi mais eficiente na extração de fenólicos totais. Os extratos etanólicos apresentaram maiores atividades antioxidantes.

Gruz e colaboradores (2013) testaram o efeito da temperatura (30°C; 40°C; 50°C), pH (2; 3; 4), solvente hidroalcoólico (30%; 50%; 70% etanol) e proporção solvente:soluto (1:1; 2:1; 3:1) na extração de compostos bioativos do bagaço de uva. Ao avaliar os extratos em relação à atividade antioxidante, as condições termodinâmicas mais favoráveis foram as extrações com maior razão solvente:substrato e maior temperatura. De acordo com os resultados obtidos, o estudo recomenda a extração com etanol:água (30:70, v/v) conduzida a 50°C, com pH 4,0, e razão solvente/substrato 3:1, para a obtenção de extrato bioativo do bagaço de uva rosada.

Já no estudo de Spigno e colaboradores (2007), que avaliou proporção de água:etanol, temperatura (45°C; 60°C) e tempo de extração (5 a 24h), o rendimento da extração mostrou-se superior a 60°C e em maiores concentrações de água, onde para até 30% de água houve um aumento na extração de fenólicos totais, taninos e ácido gálico, sem diferença na extração quando testou-se concentrações de água de 30 a 60%. A partir de 20 horas de extração percebeu-se a degradação dos compostos. A análise da composição fenólica permitiu observar que maiores concentrações de água resultaram na extração de outros compostos, o que propiciou que a concentração relativa de fenólicos tenha sido menor nestes extratos. Embora exista diferença na composição fenólica, as diferentes proporções de etanol:água não influenciaram na atividade antioxidante dos extratos.

Valduga e colaboradores (2007) ao testarem diferentes condições de pH (1; 2), volume de etanol (100; 250mL para 30 g de bagaço), tempo (3 h; 7 h) e temperatura de extração (15; 35°C), obtiveram melhores rendimentos na extração de antocianinas do bagaço de uva em pH 1 e 3 horas de extração, a temperatura de 35 °C e 250 mL de etanol.

Embora, na maioria dos casos, o aumento da temperatura, da razão solvente:soluto e do teor de solvente melhore a extração de solutos, as características da matriz e dos compostos de interesse são primordiais para se estabelecer a condição operacional mais favorável do ponto de vista termodinâmico e econômico (GRUZ et al., 2013). A diversidade de métodos de extração e resultados nos estudos existentes reflete a complexidade dos compostos fenólicos em uvas e vinhos, sem haver métodos padronizados que garantam a maximização no rendimento de obtenção de diferentes constituintes (LORRAIN et al., 2013).

2.9 Microencapsulação de compostos bioativos

A microencapsulação é uma técnica na qual substâncias no estado sólido, líquido ou gasoso são revestidas por um agente encapsulante, de maneira a formar partículas com dimensões microscópicas. Esta técnica apresenta aplicações em vários setores industriais, principalmente nos setores farmacêutico e alimentício, o que proporciona, entre muitos outros aspectos, estabilidade e uma liberação controlada dos compostos encapsulados (BRASILEIRO, 2011).

Diversas técnicas podem ser utilizadas na microencapsulação de compostos, tais como atomização, extrusão, leiteo fluidizado, liofilização, coacervação, secagem em tambor, entre outras (SHAHIDI, HAN, 1993; POSHADRI, KUNA, 2010). A liofilização, apesar de apresentar longos períodos de desidratação, é um dos mais eficientes métodos de microencapsulação de compostos termossensíveis e instáveis em soluções aquosas, uma vez que a remoção da água ocorre em condições de baixas temperaturas (MADENE et al., 2006).

Durante o processo de microencapsulação de compostos bioativos a seleção do material encapsulante é uma etapa de importância crucial. Materiais como gomas, polissacarídeos, proteínas, fibras e a mistura destes são como utilizados na microencapsulação de compostos (DAVIDOV-PARDO, AROZARENA & MARÍN-ARROYO, 2013). O agente encapsulante deve ser escolhido em função das características do composto de interesse, da aplicação pretendida e do método de formação das partículas (ZUIDAM, SHIMONI, 2010; NEDOVIC, et al., 2011).

Os agentes encapsulantes mais comumente utilizados na encapsulação de compostos bioativos para aplicação em alimentos são goma arábica, amido modificado e amido hidrolisado (GHARSALLAOUI et al., 2007). Obtida através da hidrólise ácida do amido de milho, a maltodextrina é muito utilizada nas técnicas de encapsulação, visto que apresenta alta solubilidade em água e baixa viscosidade, onde maltodextrinas com graus de dextrose-equivalente entre 10 e 20 são amplamente utilizadas na encapsulação de antocianinas e ácidos fenólicos (AHMED et al., 2010).

Diversos estudos avaliam a combinação de mais de um agente encapsulante na eficiência e estabilidade das microcápsulas, sendo que resultados controversos têm sido encontrados. Silva e colaboradores (2010) testaram maltodextrina e goma

arábica na encapsulação de antocianinas da jabuticaba, onde os melhores resultados para teores de antocianinas totais, polifenóis totais e capacidade antioxidante ocorreram quando apenas goma arábica foi utilizada.

Valduga e colaboradores (2008) realizaram a microencapsulação por *spray dryer* de antocianinas extraídas do bagaço de uvas tintas para avaliar a proporção de agente encapsulante maltodextrina:goma arábica (0:100, 50:50, 100:0) e quantidade de extrato (30-70mL). Embora a concentração de antocianinas tenha sido maior quando apenas maltodextrina foi utilizada (160 mg de antocianinas/100g), estas condições ocasionaram perdas de material na câmara de secagem do *spray-dryer* e consequente escurecimento do pigmento por caramelização dos açúcares. Portanto, a melhor condição para o encapsulamento e a secagem foi a utilização de proporções iguais de maltodextrina e goma arábica, na qual o encapsulado apresentou 95 mg de antocianinas /100g. A quantidade de extrato não interferiu na eficiência da encapsulação.

Idham e colaboradores (2012) avaliaram a influência dos agentes encapsulantes na eficiência da microencapsulação de antocianinas de hibisco, realizada por *spray-dryer*. O estudo avaliou o uso de maltodextrina, goma arábica, amido e a mistura de maltodextrina e goma arábica como agentes encapsulantes, onde a combinação de maltodextrina (40%) e goma arábica (60%) apresentou os melhores resultados (99,87% de retenção).

Melhores resultados na eficiência da microencapsulação de antocianinas, avaliados por Silva e colaboradores (2013), foram obtidos quando apenas maltodextrina foi utilizada como agente encapsulante. O estudo relata, porém, que o uso combinado de maltodextrina e goma arábica resultou em partículas mais homogêneas, o que é considerado desejável para esse tipo de produto.

No estudo de Silva e colaboradores (2014), que também avaliou a combinação de maltodextrina e goma arábica na microencapsulação de antocianinas, os melhores resultados foram encontrados quando os dois agentes encapsulantes foram utilizados na mesma proporção (50:50). A análise microscópica das partículas permitiu concluir que a mistura dos dois agentes contribuiu para partículas mais homogêneas, o que é desejável.

A microencapsulação de antocianinas do bagaço de uva também foi estudada por Souza e colaboradores (2015). O estudo verificou a influência da temperatura de

entrada do atomizador (130°C; 150°C; 170°C) e o percentual do agente encapsulante maltodextrina (10%; 20%; 30%) em relação ao extrato. As condições que resultaram em microcápsulas com maior estabilidade, capacidade antioxidante e retenção de antocianinas ocorreram na utilização de 20% de maltodextrina, atomizadas a temperatura de 130°C. O estudo concluiu que a utilização de maltodextrina como agente encapsulante resulta em pós com baixa umidade e higroscopicidade, alta solubilidade e estabilidade de cor.

2.10 Utilização de filmes biodegradáveis no armazenamento de óleos e azeites

O desenvolvimento de ranço em óleos e gorduras vegetais consiste em um dos maiores problemas em produtos altamente gordurosos e sua taxa de oxidação depende de diversos fatores, entre eles, disponibilidade de oxigênio, presença de luz e temperatura (PRISTOURI et al., 2010). A exposição desses produtos aos fatores citados tem interferência direta na qualidade e conseqüentemente, na sua aceitação por parte dos consumidores. Neste contexto, as condições de armazenamento e os materiais utilizados na embalagem de óleos e gorduras são de extrema importância para a manutenção de suas características originais (KANAVOURAS, HERNANDEZ-MUNOZ, COUTELIERIS, 2006).

Os materiais mais comumente utilizados na embalagem de óleos e azeites, os quais são geralmente vendidos em garrafas, incluem o vidro, metais e mais recentemente, plásticos (PRISTOURI et al., 2010; RIZZO et al., 2014). Ao considerar os problemas ambientais causados pelas embalagens sintéticas e a crescente busca por materiais que os substituam, estudos têm avaliado a aplicação de embalagens biodegradáveis no armazenamento de óleos e azeites (CARPINÉ et al., 2015).

O estudo de Phoopuritham e colaboradores (2011) avaliou o efeito da utilização de sachês produzidos a partir de filmes de celulose e diferentes extratos vegetais (canela, cravo e chá verde) na estabilidade oxidativa de óleo de girassol. Os óleos – os quais previamente sofreram estresse térmico (aquecidos a 150 °C e resfriados, para simular o processo de fritura) - foram armazenados em sachês e acondicionados a 45 °C, por 8 semanas. A estabilidade oxidativa foi avaliada através da formação de peróxidos e ácidos graxos livres. O estudo demonstrou que a

utilização de extrato de chá verde foi mais efetiva na proteção do óleo de girassol do que a utilização de BHA (butilhidroxianisol), um conhecido antioxidante sintético.

Reis e colaboradores (2015) avaliaram o efeito da utilização de filmes biodegradáveis a base de amido com extratos de manga e erva-mate na proteção de óleo de palma. No estudo, filmes com diferentes percentuais de extratos vegetais foram aplicados na forma de sachês para armazenamento de pequenas porções de óleo, onde a formação de peróxidos foi avaliada ao longo de 90 dias. Os sachês foram acondicionados a 30 °C em ambiente de umidade relativa controlada (63%), protegidos da luz. Os filmes biodegradáveis desenvolvidos pelo estudo foram comparados a um filme comercial de polietileno de baixa densidade, e os filmes adicionados de extratos vegetais apresentaram maior proteção às reações oxidativas no óleo avaliado. A adição de extrato de erva-mate apresentou os melhores resultados na proteção do óleo de palma, e o efeito antioxidante dos filmes foi proporcional à quantidade de extrato utilizada.

O efeito da utilização de filmes biodegradáveis no armazenamento de azeite de oliva foi avaliado por Carpiné e colaboradores (2015). Os filmes, produzidos a partir de proteína isolada de soja, óleo virgem de coco e lecitina de soja, foram utilizados em forma de sachês de azeite, os quais foram armazenados por 28 dias a 30° C, 60% de umidade relativa e fotoperíodo (12 h luz/dia), para simular as condições reais de armazenamento. A estabilidade oxidativa dos azeites embalados foi avaliada através da formação de peróxidos, a qual foi semelhante em todas as formulações desenvolvidas pelo estudo. Através das diferentes formulações avaliadas, constatou-se que a incorporação do óleo de coco não ofereceu maior proteção ao azeite de oliva embalado.

Cho e colaboradores (2010) produziram filmes em bicamada a base de zeína (proteína do milho) e proteína isolada de soja, tendo como intuito a produção de sachês com baixa permeabilidade ao oxigênio para armazenamento de azeite de oliva. Os sachês de azeite foram submetidos a diferentes condições de temperatura (30 °C, 40 °C e 50 °C) e umidade relativa (32%, 43% e 52%) por 4 meses. As propriedades mecânicas e físicas dos filmes foram investigadas, assim como a proteção fornecida pelos filmes às reações oxidativas dos azeites embalados. Os filmes desenvolvidos pelo estudo apresentaram elevada barreira ao oxigênio e maior proteção aos azeites (avaliada pela formação de peróxidos) do que filmes de

polietileno de baixa densidade-*nylon* metaloceno (frequentemente usados na embalagem de condimentos). As diferentes condições de umidade relativa não afetaram a oxidação dos azeites embalados.

CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Compostos Bioativos, do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.1 Caracterização do bagaço

O bagaço de uva tinta (*Vitis vinífera*, cv. Cabernet Sauvignon, safra 2013-2014) proveniente do processo de vinificação, foi gentilmente fornecido pela Vinícola Vanmarino, localizada em Pinto Bandeira - RS. As sementes foram removidas manualmente e as cascas e restos de polpa foram mantidas a -18 °C, a vácuo e sob proteção da luz, até o momento das análises.

O bagaço de uva foi caracterizado quanto ao seu teor de umidade, sólidos solúveis (°Brix), acidez e cinzas. As análises foram realizadas de acordo com os procedimentos analíticos estabelecidos pela metodologia de Adolfo Lutz.

A umidade do bagaço foi determinada pelo método gravimétrico, em estufa a 105 °C, até que as amostras atingissem massa constante. As cinzas foram determinadas pela calcinação em mufla a 550°C durante 12 h. Os sólidos solúveis (°Brix), foram determinados em refratômetro, e seus resultados foram corrigidos para 20°C. A acidez do bagaço foi determinada por titulometria e representada em ácido tartárico.

3.2 Obtenção dos extratos antociânicos

A fim de se obter extratos passíveis de serem utilizados em alimentos, apenas solventes de grau alimentício foram utilizados para realizar o procedimento de extração. Para tanto, uma solução hidroalcoólica de etanol (70%), acidificada com ácido clorídrico (0,1%) foi utilizada como solvente. As extrações foram realizadas em erlenmeyers de 250 mL, na proporção 1:80 (m/m) (bagaço:solvente), sob agitação

constante e proteção da luz, em banho-maria (40 °C). Para aumentar a eficiência das extrações, as mesmas ocorreram em duas etapas de 1 hora cada, evitando-se assim a saturação do solvente. Os extratos obtidos podem ser visualizados na Figura 2.

Figura 2 - Extratos de grau alimentício obtidos a partir do bagaço de uva.



3.3 Obtenção das microcápsulas

O processo de liofilização foi escolhido para realizar a microencapsulação dos compostos extraídos do bagaço. Para tanto, os extratos foram filtrados com papel filtro e concentrados em rotaevaporador (Fisatom, M802, Brasil) à vácuo, ≤ 40 °C e sob proteção da luz, até que os mesmos atingissem um décimo de seu volume inicial. Quando, eventualmente, a concentração dos extratos foi maior que a previamente estabelecida (um décimo do volume inicial), foi necessário completar o volume do extrato com água acidificada (HCl 0,1%) para padronizar o volume final obtido. A rotaevaporação visou tanto à concentração dos extratos, quanto à remoção da fração alcoólica, visto que o uso de solventes orgânicos podem danificar o liofilizador (Liotop, L101, Brasil).

Maltodextrina DE 20 (Vallen, Brasil) e goma arábica (Dinamica, Brasil) foram utilizados como agentes encapsulantes. Três tipos de soluções aquosas foram preparadas: solução de goma arábica (i), solução de maltodextrina (ii) e a combinação das mesmas (50:50) (iii), as quais foram adicionadas aos extratos concentrados e homogeneizadas manualmente. A concentração das soluções de

agente encapsulante foi realizada de forma a obter soluções finais com 30% (m/v) de agente encapsulante (SILVA et al., 2013).

Após, os três tipos de soluções resultantes foram submetidos ao processo de liofilização, a qual ocorreu até a desidratação completa das soluções. As microcápsulas foram maceradas manualmente com graal e pistilo, e posteriormente peneiradas em peneira de mesh 35 (Figura 3).

Figura 3 - Processo de maceração das microcápsulas após a liofilização



Três de tipos de microcápsulas foram obtidas nesse processo, com alteração apenas do agente encapsulante utilizado: microcápsulas de goma arábica (GA), maltodextrina (MD) e goma Arábica e maltodextrina (GA/MD) (Figura 4).

Figura 4 - Microcápsulas produzidas. Da esquerda para direita: MD, GA/MD e GA.



Microcápsulas vazias foram produzidas para avaliar a influência do agente encapsulante na atividade antioxidante das microcápsulas. Assim, a liofilização de soluções dos agentes encapsulantes puros (sem a adição dos extratos) foi realizada nas mesmas condições e concentrações realizadas com os extratos.

As microcápsulas obtidas foram armazenadas à vácuo em embalagens plásticas, sob proteção da luz.

3.3.1 Caracterização das microcápsulas

As microcápsulas foram caracterizadas quanto a composição e retenção de antocianinas, eficiência da microencapsulação, atividade antioxidante, solubilidade em água, umidade, morfologia e cor.

3.3.1.1 Identificação e quantificação de antocianinas

O teor de antocianinas foi avaliado nos extratos e nas microcápsulas obtidas. Nesta análise foram identificadas e quantificadas as antocianinas mais frequentemente encontradas em uvas tintas *Vitis vinifera*, sendo estas: malvidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo e cianidina-3-glicosídeo (FRAIGE, PEREIRA-FILHO, CARRILHO, 2014). A identificação e quantificação dos compostos foi efetuada comparando os tempos de retenção e áreas dos picos da amostra e de seus respectivos padrões, nas mesmas condições cromatográficas. Todos os padrões foram adquiridos através da marca Sigma (EUA): malvidina-3-glicosídeo (CAS 7228-78-6, ≥90,0%), delphinidina-3-glicosídeo (CAS 6906-38-3, ≥97.0%), petunidina-3-glicosídeo (CAS 6988-81-4, ≥95.0%,) e cianidina-3-glicosídeo (CAS 7084-24-4, ≥95.0%). A soma individual das antocianinas avaliadas foi representada com antocianinas totais (AT).

Para analisar o teor de antocianinas no extrato, o mesmo foi seco em nitrogênio líquido e rediluído em metanol acidificado (HCl 0,1%). Após serem filtradas em membrana (Millex, diâmetro de 13mm e poro de 0,45µm) as amostras foram diretamente injetadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência.

Para avaliar as antocianinas presentes nas microcápsulas, a extração dos pigmentos foi realizada com uma mistura de metanol:água (50:50), acidificados com

ácido clorídrico (HCl 0,1%). Ao considerar que os agentes encapsulantes (maltodextrina e goma arábica) são parcialmente insolúveis em solventes orgânicos, a presença de 50% de água como solvente de extração é utilizada com o intuito de romper as microcápsulas, para dissolver o agente encapsulante e liberar as antocianinas encapsuladas. Para garantir a liberação das mesmas, as misturas (microcápsulas e solvente de extração) permaneceram em ultrassom por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas (3500×g, 10 min), filtradas (Millex, diâmetro de 13 mm e poro de 0,45µm) e injetadas no cromatógrafo.

3.3.1.2 *Condições Cromatográficas*

A quantificação e identificação das antocianinas foi realizada via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para tanto, utilizou-se uma coluna de fase reversa C18 Shim-pak CLC-ODS (5 µm, 250 x 4,6 mm), fase móvel com gradiente linear de eluição com 5% ácido fórmico aquoso/metanol de 85:15 (v/v) a 20:80 em 25 minutos, sendo mantida essa proporção isocrática por 15 minutos. O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/min, o volume de injeção foi de 5 µL e a temperatura da coluna mantida a 29° C. Os cromatogramas foram processados em comprimento de onda fixo de 520 nm.

A identificação e quantificação dos compostos foi efetuada pela comparação dos tempos de retenção e áreas dos picos da amostra e de seus respectivos padrões, nas mesmas condições cromatográficas. Para quantificar os compostos, curvas padrões foram construídas. As faixas de concentração utilizadas para obtenção das curvas padrão e os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de cada composto estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1 - Faixas de concentração, limites de detecção (LD) e Limites de quantificação (LQ) das antocianinas quantificadas via CLAE.

Antocianina	Faixa de concentração (mg/mL)	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
malvidina-3-glicosídeo	5–50	2.07×10^{-2}	3.45×10^{-2}
delfinidina-3-glicosídeo	5–100	1.16×10^{-1}	1.93×10^{-1}
petunidina-3-glicosídeo	3–40	0.66×10^{-2}	1.1×10^{-2}
cianidina-3-glicosídeo	5–40	1.69×10^{-2}	2.81×10^{-2}

3.3.1.3 Retenção de Antocianinas (AR) e Eficiência da microencapsulação (ME)

A retenção de antocianinas (AR) nas microcápsulas está relacionada à quantidade de pigmentos presentes nas microcápsulas em relação aos presentes no extrato, em valor percentual (ver Identificação e Quantificação de antocianinas).

Já a eficiência da microencapsulação (ME) refere-se à quantidade de antocianinas fortemente ligadas ao agente encapsulante em relação à totalidade presente nas microcápsula. A análise é realizada pela diferença entre a totalidade de antocianinas retidas nas microcápsulas, extraídas com solvente capaz de dissolver o agente encapsulante e liberar os pigmentos (metanol:água 50:50), e os compostos fracamente ligados ao agente encapsulante, considerados como antocianinas da superfície (AS), através da extração com metanol:etanol (50:50) (SAÉNZ et al., 2009), ou seja, solventes que não são capazes de dissolver os agentes encapsulantes das microcápsulas. O cálculo da eficiência da microencapsulação foi realizado conforme a equação a seguir:

$$ME\% = \left(\frac{AR - AS}{AR} \right) \times 100$$

onde ME% = eficiência da microencapsulação, em valor percentual; AR = quantidade total de antocianinas nas microcápsulas; AS = antocianinas localizadas na superfície das microcápsulas.

3.3.1.4 *Atividade antioxidante medida pela captura do radical ABTS*

A atividade antioxidante das microcápsulas foi avaliada através do método de captura do radical ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), seguindo a metodologia de Re e colaboradores (1999), com algumas modificações.

A atividade antioxidante das microcápsulas foi avaliada em água em pH 3 (o qual foi escolhido em função do pH da solução filmogênica posteriormente realizada para a obtenção dos filmes biodegradáveis). As microcápsulas foram adicionadas de água e ultrassonicadas por 10 minutos. Após centrifugação (3000×g, 10 min; Centrífuga Sigma 4K15, Alemanha), o sobrenadante foi coletado e teve sua atividade antioxidante avaliada conforme descrição a seguir.

O radical ABTS+• foi produzido através da reação de 5 mL de uma solução estoque de ABTS (7 mM) com 88 µL de persulfato de potássio (140 mM). A mistura permaneceu em repouso por 16h, sob proteção da luz, até o momento das análises. O radical ABTS produzido foi diluído em uma solução tampão fosfato 0,05M (pH 3), até absorvância de 0.700 ± 0.050 a 734 nm (Espectrofotômetro Shimadzu CPS-240A, Japão). Em tubos de ensaio, 30 µL de cada amostra foram adicionados de 3 mL da solução ABTS diluída, agitada em Vortex e submetida à leitura em espectrofotômetro após 6 minutos de reação. Uma curva padrão foi construída a partir de soluções com diferentes concentrações de trolox (100 – 2000 µM).

A fim de avaliar a interferência do agente encapsulante na atividade antioxidante das microcápsulas, a análise foi também realizada em microcápsulas vazias.

É importante ressaltar que a análise utilizou uma solução tampão fosfato em substituição ao etanol (como sugere a metodologia original). Esta substituição foi feita visto que a presença de álcool provoca a insolubilização e conseqüente aglomeração das microcápsulas, o que torna as soluções turvas e incapazes de serem avaliadas via espectrofotometria.

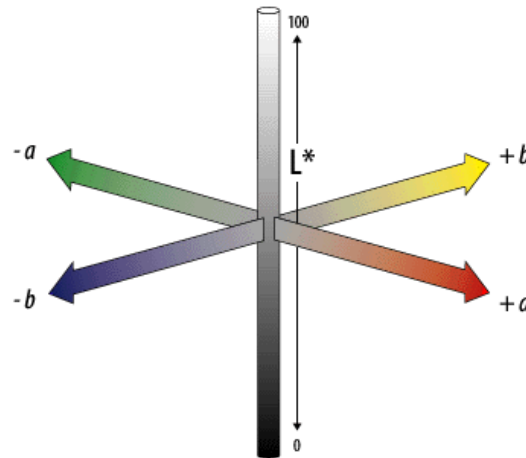
3.3.1.5 *Umidade e solubilidade em água*

A umidade das microcápsulas foi avaliada de acordo com a metodologia da AOAC, onde 1 g de amostra foi pesado e teve sua perda de massa avaliada após 3 h em estufa a 105 °C.

A solubilidade das microcápsulas em água foi determinada de acordo com o procedimento estabelecido por Anderson (1982), com modificações. Para tanto, 2,5 g de amostra foram colocados em tubos de ensaio, e 30 mL de água destilada foram adicionados em cada tubo, agitados vigorosamente com auxílio de Vortex. Os tubos permaneceram por 30 min sob agitação constante em banho-maria, a 25 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado em placas de Petri previamente pesadas, as quais foram colocadas em estufa a 105 °C até secagem completa (até peso constante). A solubilidade, apresentada em percentual, foi calculada pela quantidade de sólidos presentes no sobrenadante seco em relação à amostra original (2,5 g).

3.3.1.6 *Estabilidade da cor*

A estabilidade de cor das microcápsulas foi avaliada ao longo de 42 dias, onde as mesmas foram mantidas a 25 °C em embalagens de nylon, à vácuo, sob proteção da luz. A análise de cor das microcápsulas foi realizada no dia de seu preparo, após 21 e 42 dias de armazenamento, em colorímetro (modelo CR-300, Minolta Co. Ltd, Japão) através dos parâmetros de cor CIELab (Figura 5). Os parâmetros L* (luminosidade), a* (vermelho-verde) e b*(amarelo-azul) foram determinados após calibração com um disco branco (L0*: 94.97; a0*: 0.12 e b0*: 1.7).

Figura 5- Parâmetro CIELab de cores

Fonte: Guia Técnico – CIELab, Adobe Systems Incorporated

3.4 Desenvolvimento dos filmes biodegradáveis

Esta etapa teve como objetivo desenvolver três formulações de filmes biodegradáveis, cada uma com um tipo de microcápsula de antocianinas: filme com GA – F.GA; filme com MD – F.MD e filme com GA/MD – F.GA/MD. Diversos testes de bancada foram necessários até que as formulações desenvolvidas apresentassem características satisfatórias, tais como maleabilidade, facilidade de remoção das placas e uniformidade. Com o intuito de dar características antioxidantes ao filme, estes foram desenvolvidos de maneira que apresentassem a maior quantidade de microcápsulas possível, o que fez com que o agente encapsulante representasse o componente majoritário das soluções filmogênicas. Amido de mandioca, glicerol e microcápsulas foram testados em diferentes proporções ao longo do processo de desenvolvimento, cujas formulações estão apresentadas na Tabela 2. Visto que os filmes produzidos com microcápsulas de goma arábica (F.GA e F.GA/MD) apresentavam estrutura mais quebradiça, fez-se necessário utilizar um maior percentual de agente plastificante (glicerol) nestas formulações. A mesma proporção microcápsulas:amido foi mantida em todos os filmes.

Tabela 2 - Formulações das soluções filmogênicas dos filmes elaborados com: microcápsulas de goma Arábica (F.GA); microcápsulas de goma Arábica e maltodextrina (F.GA/MD); microcápsulas de maltodextrina (F.MD)

	F.GA	F.GA/MD	F.MD
Amido (%)	3,5	3,5	5
Glicerol (%)	2,3	2	2
Microcápsulas (%)	5,6	5,6	8
Água (%)	88,6	88,9	85
Microcápsulas:Amido	1:0,625	1:0,625	1:0,625

Inicialmente, amido de mandioca (Stival, Brasil), glicerol (Dinamica, Brasil) e água destilada foram misturados e aquecidos para promover a gelatinização do amido, em banho-maria (De Leo B450) a 80 °C por 5 minutos, sob agitação constante. A fim de preservar as microcápsulas da degradação térmica, as mesmas foram incorporadas à solução filmogênica após o resfriamento ($T \leq 40$ °C). Para remover pequenas bolhas, as soluções foram mantidas sob agitação mecânica (agitador modelo 713-D, Fisatom, Brasil) por 10 min (Figura 6), sem aquecimento, quando então foram submetidas ao vácuo em recipiente de vidro por 2 minutos.

A técnica de *casting* foi utilizada para a obtenção dos filmes, onde as soluções filmogênicas foram vertidas em placas acrílicas (29,2 g de solução/placa – artigo 1; 50 g de solução/placa – artigo 2) e submetidas a secagem em estufa com circulação forçada de ar a 40 °C por 7 horas (artigo 1) e 9 horas (artigo 2) (Figura 7).

Figura 6 - Processo de remoção de bolhas: solução filmogênica sob agitação

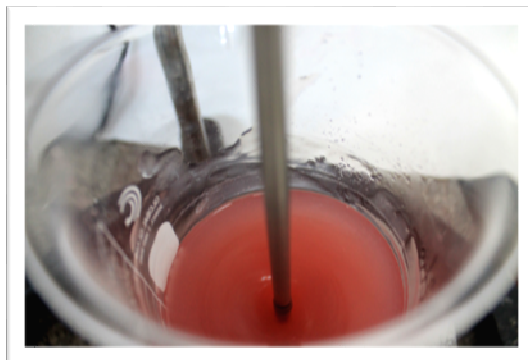
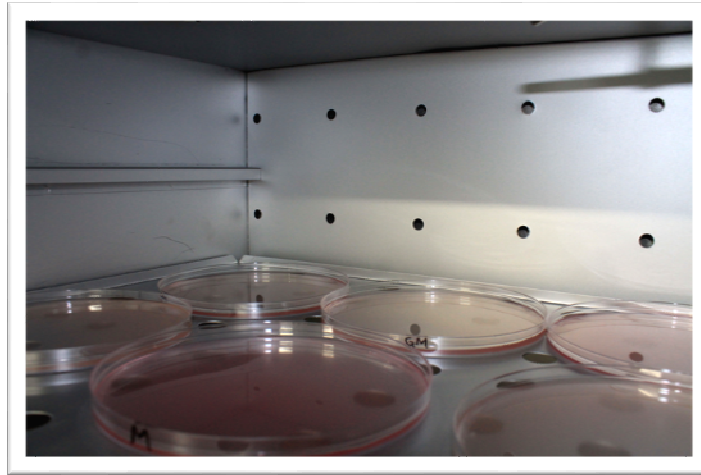


Figura 7 - Processo de secagem dos filmes em estufa com circulação forçada de ar



3.5 Caracterização dos filmes

3.5.1 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram avaliadas quanto a sua resistência à tração e porcentagem de alongação conforme a metodologia ASTM D882. Previamente, 10 tiras de cada formulação foram cortadas em forma retangular, para formar corpos de prova de 70 mm x 20 mm, os quais foram mantidos sob umidade relativa controlada (58%) por 48 h. Cada corpo de prova teve sua espessura medida com micrômetro digital (MDC-25, Mitutoyo Corp, Japão, precisão de 0,001 mm, resolução / 0 mm ~ 25 mm) em três diferentes pontos. Posteriormente, a menor espessura foi utilizada no software do texturômetro, pois de acordo com a metodologia de análise (ASTM D882) considera-se a região de menor espessura de cada corpo de prova como o ponto onde ocorre a ruptura do filme.

As análises, realizadas em texturômetro TA-XT2 (Figura 8) (Stable Micro Systems, Surrey, RU), ocorreram a 25 °C, com separação inicial das garras de 50 mm e velocidade do probe de 80 mm/minuto. Os parâmetros foram determinados a partir das curvas de estresse-deformação obtidas e calculadas de acordo com a ASTM D882.

Figura 8 - Análise das propriedades mecânicas dos filmes realizada em texturômetro.



3.5.2 Permeabilidade ao Vapor d'água

A permeabilidade ao vapor d'água (PVA) dos filmes foi avaliada pelo método gravimétrico descrito por Talja et al. (2008), com algumas modificações. Os filmes foram fixados em células de permeação de alumínio (diâmetro interno: 63 milímetros; altura: 25 mm) com CaCl_2 anidro granular e mantidos em cuba de vidro. A temperatura da cuba foi mantida a 25 °C e foi usado uma solução saturada de NaCl, para alcançar um gradiente de umidade relativa de 0 a 74 %. O ganho de massa do conjunto célula de permeação/filme/ CaCl_2 anidro foi avaliado após 24 h, onde cada conjunto foi pesado em balança analítica (AY Shimadzu, Japão). Para a determinação da PVA, a seguinte equação foi utilizada:

$$PVA = \frac{w \times L}{A \times t \times \Delta p}$$

onde w é a massa de água permeada através do filme (g) dada pela diferença de peso após 24 horas, L é a espessura do filme (mm), A é a área de permeação, t é o tempo de permeação (h), e Δp é a diferença de pressão de vapor entre os dois lados do filme (Pa).

3.5.3 Propriedades ópticas

As propriedades ópticas dos filmes foram avaliadas em triplicata e medidas através de espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800, Japão) na faixa de comprimento de onda entre 200 nm e 700 nm, com o uso de cubeta de quartzo vazia como referência. Para tanto, os filmes foram cortados de forma retangular e colocados nas cubetas de quartzo para leitura e a opacidade foi calculada pelo valor da absorbância a 600 nm dividido pela espessura dos filmes (mm) (WANG et al., 2013) e a transparência dos filmes foi avaliada através da medida da transmitância a 500 nm (TANG et al., 2005).

3.5.4 Biodegradabilidade

A biodegradabilidade dos filmes foi avaliada através da metodologia descrita por Martucci e Ruseckaite (2009) com algumas modificações. O método é baseado na avaliação da biodegradação dos filmes quando os mesmos são enterrados e expostos à microbiota natural encontrada no solo. Para isso, caixas de plástico compartimentadas (6 cm x 6 cm x 6,5 cm) foram adicionadas de solo orgânico natural (pH~7,2) empregado como meio para degradação dos filmes.

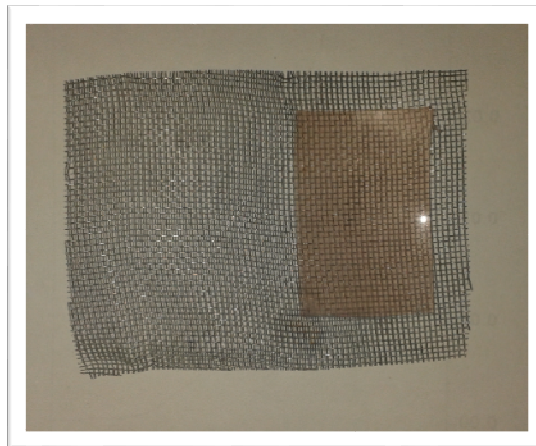
Os filmes foram cortados em retângulos (2 cm x 3 cm), desidratadas a 60 °C em estufa (modelo TLK48, DeLeo, Brasil) até massa constante (m_0), e acondicionados em malhas de alumínio (previamente secas e pesadas) (Figura 9). As malhas com as amostras foram dobradas, colocadas a uma profundidade de 4 cm a partir da superfície do recipiente e cobertas pelo solo orgânico. Água foi adicionada ao solo a cada dois dias para manter a umidade a cerca de 40%.

O experimento foi conduzido por 10 dias, em duplicata, onde ao fim do período o conjunto malha+filme foi desenterrado e retirado do contato com o solo com o auxílio de uma pinça. Os conjuntos foram cuidadosamente lavados com água destilada para retirar resquícios de terra e superficialmente secos com a ajuda de papel filtro. Em seguida, foram submetidos à secagem a 60 °C (modelo TLK48, DeLeo, Brasil) até peso constante. O grau de biodegradação das películas foi determinado como a perda de peso (WL;%), pela equação:

$$WL (\%) = \left(\frac{m_{10} - m_0}{m_0} \right) \times 100$$

onde m_0 é a massa inicial da amostra seca de filme e m_{10} é a massa seca remanescente após 10 dias.

Figura 9 - Amostra de filme biodegradável (2 cm x 3 cm) acondicionada sobre malha de alumínio.



3.5.5 Atividade antioxidante: proteção aos processos oxidativos de óleo de girassol

A atividade antioxidante dos filmes foi medida através da capacidade dos filmes em retardar a oxidação primária de óleo de girassol, pela metodologia de Colín-Chávez et al. (2013), com adaptações. Para isso, os filmes foram dobrados e selados termicamente em dois lados, mantendo uma das partes abertas. Após, 15 mL de óleo de girassol (sem antioxidantes artificialmente incorporados) foram adicionados, e a embalagem formada foi selada termicamente para formar sachês

retangulares de 10 cm x 7,5 cm. Como controle utilizou-se amostras de óleo de girassol diretamente expostas ao ar, sem qualquer tipo de proteção, em placas de Petri de vidro aberto. As amostras, mantidas por 9 dias à temperatura de 40 °C, 54% UR e expostas à luz fluorescente (intensidade 900-1000 lux), tiveram seu índice de peróxidos avaliado pela metodologia IUPAC a cada 3 dias, em triplicata.

3.5.6 Análise da superfície de filmes e morfologia das microcápsulas

Os filmes e as microcápsulas desenvolvidas neste estudo tiveram sua superfície e morfologia avaliadas via microscopia eletrônica de varredura (Modelo JSM 6060, JEOL, Japão). Para isso, uma pequena quantidade da amostra foi fixada em stubs de alumínio com o auxílio de fita dupla-face e o conjunto foi recoberto por uma fina camada de ouro. As amostras foram analisadas em voltagem de 5 kV e aumento de 500x a 1000x.

3.6 Aplicação dos filmes desenvolvidos: armazenamento de azeite de oliva extra-virgem

Após a caracterização dos filmes desenvolvidos, escolheu-se o filme com melhores características para realizar a aplicação em uma matriz alimentícia. Assim, sachês para armazenamento de azeite de oliva extra-virgem foram produzidos com o intuito de embalar pequenas porções, para propiciar praticidade aos consumidores que consomem o produto na forma de condimento. Um filme comercial de polipropileno foi utilizado para fins de comparação. Para tanto, sachês foram produzidos conforme descrito em 3.5.5, onde 20 mL de azeite de oliva extra-virgem (Alantejo - Portugal, safra 2013-2014, sem antioxidantes artificialmente incorporados) foram adicionados. Os sachês foram selados termicamente de forma a evitar a presença de bolhas de ar e assim reduzir a influência do espaço de cabeça na qualidade do azeite embalado.

3.6.1 Manutenção da qualidade do azeite de oliva extra-virgem (EVOO) sob condições aceleradas de degradação.

A qualidade de óleos e azeites está relacionada principalmente com a estabilidade oxidativa e pode ser determinada ao longo do período de armazenamento sob luz e temperatura que reproduzam as condições às quais os produtos são naturalmente expostos antes e após a sua comercialização. Entretanto, o processo de oxidação de azeites sob condições de luz e temperatura amenas costuma ser lento, de forma que testes utilizados para realizar a previsão do tempo de prateleira de produtos são frequentemente realizados em condições que acelerem sua degradação: exposição à luz e a altas temperaturas.

Neste contexto, os sachês de azeite de oliva extra-virgem foram submetidos a um ambiente acelerado de degradação ($40\pm 2^\circ\text{C}$; exposição a lâmpadas fluorescentes: 900-1000 lux) e umidade relativa controlada (54%). A qualidade dos azeites embalados foi avaliada ao longo de 12 dias, através de análises de índice de peróxidos, coeficiente de determinação de dienos (K_{232}), acidez titulável, carotenoides, clorofila e cor. Como controle foi utilizada uma amostra de azeite sem qualquer embalagem, a qual foi colocada em placas de Petri de vidro aberto mantendo a mesma proporção volume/área de troca das amostras embaladas em sachês. As amostras foram avaliadas em triplicata.

3.6.1.1 *Índice de peróxidos, K_{232} e acidez dos azeites.*

O índice de peróxidos (PV) e a acidez dos azeites foram determinados através de titulometria, seguindo a metodologia IUPAC para análise de óleos, gorduras e derivados, onde PV foi representado em milliequivalente de O_2 ativo/kg de óleo (mEq/kg) e acidez foi expressa em percentual de ácido oleico.

O coeficiente de determinação de dienos (K_{232}), no qual verifica-se a presença de compostos primários e secundários de oxidação (hidroperóxidos, aldeídos, cetonas, entre outros) foi analisado conforme a metodologia analítica da Regulação Europeia EC 2568/91. Na análise, o K_{232} dos azeites foi calculado a partir da absorção a 232 nm de uma solução de azeite a 1% (v/v) em iso-octano (grau HPLC),

em cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico, medida em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Japão).

3.6.1.2 *Carotenoides e clorofila*

Os teores de carotenoides e clorofila dos azeites foram analisados conforme a metodologia descrita por Mínguez-Mosquera et al. (1991), onde as absorbâncias das frações dominantes de cada pigmento para azeites de oliva foram utilizadas: clorofila, avaliada pela presença de feofitina “a” ($E_o = 613, 670 \text{ nm}$) e carotenoides, avaliada pela presença de luteína ($E_o = 2000, 472 \text{ nm}$). Inicialmente, 1,5 g de amostra de azeite foram diluídos em 5 mL de ciclohexano e colocados em cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico. A leitura da absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Japão) a 670 nm para clorofila e 472 nm para carotenoides, onde o cálculo foi realizado conforme as equações a seguir:

$$[\textit{clorofila}] = (A_{670} \times 10^6) / (613 \times 100 \times \textit{densidade}) \text{ mg/kg}$$

$$[\textit{carotenoides}] = (A_{472} \times 10^6) / (2000 \times 100 \times \textit{densidade}) \text{ mg/kg}$$

3.6.1.3 *Cor*

A análise de cor dos azeites foi realizada utilizando colorímetro (modelo CR-300, Minolta Co. Ltd, Japão) através dos parâmetros de cor CIELab. Os parâmetros a^* (vermelho-verde) e b^* (amarelo-azul) foram determinados, utilizando um disco branco ($a0^*: 0.12$ e $b0^*: 1.7$) para calibração. Para a análise, 2 mL de azeite foram colocados sobre uma placa de Petri de vidro posicionada sobre o disco branco de calibração. O azeite foi coberto com uma placa fina de vidro. O conjunto disco branco/placa de Petri/placa fina de vidro foi utilizado como controle ($a^*: 0.01$ e $b^*: 1.72$). As amostras foram analisadas em triplicata.

3.7 Análise estatística

As análises, realizadas em triplicata, tiveram seus resultados submetidos à análise estatística utilizando ANOVA, com teste de comparação de médias de Tukey ao nível de 5% de significância, através do programa Statistica 12.0. (Statsoft, São Paulo, Brasil).

CAPÍTULO 4 – ARTIGOS CIENTÍFICOS

ARTIGO 1

Microencapsulation of anthocyanins with different wall materials and its application in active biodegradable films

Artigo publicado na revista Food and Bioprocess Technology

ABSTRACT

Wine grape pomace, a by-product known for its high polyphenolic content, was used as a source of anthocyanins in the acquisition of active biodegradable films, which were produced with anthocyanins encapsulated with different wall materials endowed with film forming properties. Gum arabic and maltodextrin were used in different proportions during the encapsulation process, and the anthocyanin contents of the powders obtained were quantified by HPLC, resulting in up to 91.5% retention. The antioxidant properties, solubility and color stability of powders were analyzed. Because the microcapsules were added in the highest proportion, it was considered the major component in the formation of films. Microcapsules produced with gum arabic showed higher antioxidant activity as compared to microcapsules produced with maltodextrin. Nevertheless, based on a comparison of the films obtained in this study, the films made with anthocyanins encapsulated with maltodextrin showed better mechanical properties and higher protective effect on oil oxidation, which makes maltodextrin a promising material enabling the formation of films with satisfactory mechanical properties endowed with anthocyanins.

Keywords: grape pomace; gum arabic; maltodextrin; antioxidant activity; HPLC

1. Introduction

Anthocyanins are one of the largest and most widespread groups of plant constituents, known as flavonoids, and are responsible for the bright attractive colors of most fruits, vegetables, flowers and some cereal grains. In addition to its coloring properties, anthocyanins are known for their possible health benefits as dietary antioxidants, which help to prevent neuronal diseases, cardiovascular illnesses, cancer, diabetes, inflammation and many other diseases (Yousuf et al., 2015).

The high antioxidant activity of anthocyanins is generally attributed to their peculiar structure, which allows the easy donation of H atoms from aromatic hydroxyl groups, thus improving the capacity to bear the impaired electron via conjugation with the π -electron system (Tsuda et al., 1996). Hence, anthocyanins have been described as effective scavengers of reactive oxygen species, thus avoiding the propagation of new free radical species, which catalyze lipid oxidation and may cause damage in several systems (Van Acker et al., 1996).

Wine grape pomace (WGP), which is contained in skins, seeds and the remainder of the pulp is rich in many bioactive compounds that are left after the winemaking process, including a considerable amount of anthocyanins (Fontana et al., 2013). While grape seed is rich in extractable phenolic antioxidants such as phenolic acid, flavonoids, procyanidins and resveratrol, grape skins contain abundant anthocyanins, compounds that make WGP a by-product of high interest in the pursuit of bioactive compounds (Melo et al., 2015).

The incorporation of anthocyanins into food and medical products is a challenging task due to their low stability towards environmental conditions during processing and storage. Encapsulation is an efficient way to introduce such compounds into these products. Wall materials, also called encapsulating agents, act as a protective coating against ambient adverse conditions such as light, humidity and oxygen. Encapsulated bioactive compounds are easier to handle and offer improved stability (Yousuf et al., 2015).

Methods of encapsulation of food ingredients include spray-drying, freeze-drying, fluidized bed-coating, extrusion, cocrystallization, molecular inclusion, and coacervation. (Shahidi, Han, 1993). Freeze drying, despite of its long dehydration

period, is an efficient method for anthocyanin encapsulation to produce a porous, nonshrunken structure especially useful for temperature-sensitive active agents like anthocyanins (Zuidam, Shimoni, 2010; Mahdavi et al., 2014)

Wall materials used in microencapsulation include gums, polysaccharides, lipids, proteins, fibers and mixtures of these materials (Davidov-Pardo, Arozarena & Marín-Arroyo, 2013). The selection of an adequate wall material is important for the stability of the compounds, and several authors have shown the effective usage of maltodextrin and gum arabic (GA, E414) to encapsulate anthocyanins (Idham, Muhamad, Sarmidi, 2012; Souza et al., 2015; Silva, Vieira, Hubinger, 2014).

Gum arabic, an exudate from Acacia trees, is principally a mixture of polysaccharides and proteoglycans, the latter being arabinogalactan proteins (Gharsallaoui et al., 2007). Maltodextrins are formed by partially hydrolyzing corn flour with acids or enzymes, and they are supplied as dextrose equivalents (DE), a measure of the degree of starch polymer hydrolysis, where maltodextrins with degrees of DE between 10 and 20 are widely used in the encapsulation of anthocyanins (Madene et al., 2006). Both materials are commonly used as wall materials due to favorable properties of emulsification, water solubility, low viscosity at high concentrations, biodegradability and film formation (Gharsallaoui et al., 2007; Silva, Vieira, Hubinger, 2014).

Considering the properties of encapsulation and film formation of gum arabic and maltodextrin, it is possible and convenient to produce active biodegradable films with bioactive compounds microencapsulated with these materials. Active films can be described as auxiliary systems for food preservation, where substances are released from the film to the food surface with which they are in contact (Bodaghi et al., 2013).

To minimize the consumption of conservative chemical additives and, therefore, the adverse health effects, the technology of active packaging films with natural antioxidants presents an alternative (Júnior et al., 2015). Several natural antioxidants have been incorporated into films in order to promote greater stability to lipid oxidation of fatty products and to extend the shelf-life of highly perishable products. (Gomez-Estaca et al., 2014).

Cassava starch, which is known to form odorless, tasteless, colorless, non-toxic and biologically degradable films (Flores et al., 2007), was selected to produce films with anthocyanins encapsulated with different wall materials. The objective of this study was to analyze the influence of wall materials, gum arabic and maltodextrin, on the microencapsulation of anthocyanins extracted from WGP and their effect on active biodegradable films properties.

2. Materials and Methods

The Cabernet Sauvignon grape pomace (79.98±0.40% moisture; 0.15±0.00% acidity in tartaric acid; pH 3.41±0.02; total soluble solids 6.35±0.01°Brix; 1.18 ±0.04% ash; 2013-2014 vintage) derived from the wine-making process was provided by Vanmarino Winery (Pinto Bandeira - RS). The seeds were manually removed, and the skins and the remainder of the pulp were stored at -18 °C until the time of analysis.

2.1. Preparation of grape pomace extracts

The anthocyanin extraction followed the procedure of Srivastava and Vankar (2010) with modifications. The food grade anthocyanin extraction was performed using a hydroalcoholic solvent composed of 70% ethanol, acidified with HCl (0.1%), in a proportion of 1:80 (grape pomace:solvent). The extraction occurred in two stages of one hour each in a water bath (40° C) under stirring and protected from light.

2.2. Microcapsule formation

The freeze-drying process (Freeze-Dryer Liotop, L101, Brazil) was used to microencapsulate the extracted compounds. Extracts were concentrated in a Fisatom rotaevaporator (M802, Brazil) at 40 °C until the alcoholic fraction was completely removed and were then re-diluted in acidified water (0.1% HCl) until achieving one-tenth of the original extract volume. Maltodextrin DE 20 (Vallen, Brasil) and gum

arabic (Dinamica, Brazil) were used as wall materials, where solutions were prepared at a final concentration of 30% (w/v) prior to the addition of the pomace extracts (Silva et al., 2013). Three types of microencapsulated powders (MP) were obtained, differing from each other by the wall material solutions utilized: (i) 30% maltodextrin (MD), (ii) a mixture of 15% gum arabic and 15% maltodextrin (GA/MD), and (iii) 30% gum arabic (GA). The samples were freeze-dried for 72 hours under protection from light, manually macerated and sieved (mesh 35). The freeze-drying of pure wall material solutions was performed under the same conditions to obtain empty capsules (Empty MP). The powders were stored under vacuum in a nylon multilayer packaging under protection from light.

2.3. Anthocyanin content

To identify and quantify the anthocyanins present in the pomace extract, the extract was dried in nitrogen and stored at -18 ° C under protection from light until the time of chromatographic analysis, when it was re-diluted in acidified methanol (HCl 0.1%). The anthocyanin retention (AR) of the MP was measured by extraction with acidified methanol:water (50:50), followed by centrifugation (3500×g, 10 min). High-efficiency liquid chromatography (HPLC) was used to quantify the anthocyanins, and the AR was represented as the percentage of anthocyanins retained in the powder when compared to the extract. The sum of individually assessed anthocyanins was considered as the total anthocyanins (AT).

2.4. Chromatographic conditions

Anthocyanin quantification was performed via HPLC. For this analysis an HPLC chromatograph (Agilent 1100 Series, Santa Clara, CA, USA) equipped with a quaternary pump system solvent and a UV–visible detector was used with a C18 Shim-Pak CLC-ODS column (5 microns, 250 x 4.6 mm). The mobile phase consisted of a linear gradient elution of 5% aqueous formic acid/methanol 85:15 (v/v) to 20:80 over 25 min, and this isocratic ratio was maintained for 15 minutes. The mobile

phase flow was 0.8 mL/min, the injection volume was 5 μ l and the column temperature was maintained at 29 °C. The chromatograms were processed at a fixed wavelength of 520 nm.

This analysis identified and quantified the anthocyanins most often found in *Vitis vinifera* grapes (Fraige, Pereira-Filho, Carrilho, 2014), of which standards were purchased from Sigma-Aldrich (USA): malvidin-3-glucoside (CAS 7228-78-6, $\geq 90,0\%$), delphinidin-3-glucoside (CAS 6906-38-3, $\geq 97,0\%$), petunidin-3-glucoside (CAS 6988-81-4, $\geq 95,0\%$) and cyanidin-3-glucoside (CAS 7084-24-4, $\geq 95,0\%$). The identification and quantification of compounds were performed by comparing retention times and peak areas of the samples and their respective standards under the same chromatographic conditions. For quantification, a standard curve was constructed in the following concentration ranges for the anthocyanins: malvidin-3-glucoside, 5–50 mg/mL; delphinidin-3-glucoside, 5–100 mg/mL; petunidin-3-glucoside, 3–40 mg/mL; cyanidin-3-glucoside, 5–40 mg/mL.

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were as follows: malvidin-3-glucoside, $2,07 \times 10^{-2}$ and $3,45 \times 10^{-2}$ μ g/mL; delphinidin-3-glucoside, $1,16 \times 10^{-1}$ and $1,93 \times 10^{-1}$ μ g/mL; petunidin-3-glucoside, $0,66 \times 10^{-2}$ and $1,1 \times 10^{-2}$ μ g/mL; cyanidin-3-glucoside, $1,69 \times 10^{-2}$ and $2,81 \times 10^{-2}$ μ g/mL.

2.5. Microencapsulated powders (MP) characterization

2.5.1. Microencapsulation efficiency (ME)

The ME was defined as the difference between the AR and the anthocyanins located in the microcapsule surface (AS). To quantify the AS, the procedure of Saénz et al. (2009) was followed: 200 mg of each MP was treated with 1 mL of a mixture of ethanol and methanol (1:1). These dispersions were stirred in a Vortex at room temperature for 1 min and then centrifuged ($3500 \times g$, 10 min). The anthocyanins were quantified by HPLC. The ME percentage was calculated according to eq (1). All analyses were performed in triplicate.

$$\text{ME \%} = \left(\frac{\text{AR} - \text{AS}}{\text{AR}} \right) \times 100 \quad (1)$$

2.5.2. ABTS radical scavenging activity

The ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) scavenging capacity of the MP samples was determined according to a modified method of Re et al. (1999). ABTS^{•+} radical cations were produced by reacting 5 mL of ABTS (7 mM) stock solution with 88 µL of potassium persulfate (140 mM) and allowing the mixture to stand in the dark at room temperature for 16 h before use.

To analyze the antioxidant activity of the pomace extract, the ABTS^{•+} solution was diluted with ethanol to an absorbance of 0.700 ± 0.050 at 734 nm (Spectrophotometer Shimadzu CPS-240A, Japan). After the addition of 30 µL of sample of trolox standard to 3 mL of diluted ABTS^{•+} solution, the absorbance values were recorded 6 min after mixing.

The antioxidant activity of the MP and the Empty MP in aqueous solution was analyzed. The MPs were solubilized in acidified water, sonicated for 10 min, and centrifuged (3000×g, 10 min; Sigma Centrifugal 4K15, Germany), and the supernatant was collected and analyzed. The ABTS assay was measured under the same conditions described for the grape pomace extract, but the ethanol was substituted for an aqueous buffer solution, pH 3.

Solutions of known trolox concentrations were used for calibration, and the results were expressed as I M trolox/g dry grape pomace and I M trolox/g MP for the grape pomace extract and MP, respectively.

2.5.3. Moisture and Water Solubility Index

The moisture content was determined using the AOAC method, where mass loss was determined after 1 g of MP was placed in an oven dryer at 105 °C for 3 h. The water solubility index (WSI) was determined according to the procedure of Anderson (1982) with modifications. MP (2.5 g) and water (30 mL) were vigorously mixed in a centrifuge tube, incubated in a 25 °C water bath for 30 min, and then centrifuged (3500×g, 15 min). The supernatant was collected in a pre-weighed Petri

dish, and the residue was weighed after oven-drying overnight at 105 °C (DeLeo DL-SE-X, Brazil). The amount of solids in the dried supernatant as a percentage of the total dry solids in the original 2.5-g sample was an indicator of WSI.

2.5.4. Color stability

The MPs were stored at 25°C under vacuum in a nylon multilayer packaging that was protected from light. MP color was analyzed on the day of acquisition (day 0) and after 21 and 42 days, in triplicate. The color was measured using a colorimeter (Hunter Lab system, model Miniscan XE, USA) using the CIELab color parameters. The parameters L*(luminosity), a* (red–green) and b* (yellow–blue) were determined. A white disk (L^{*}: 94.97; a₀^{*}: 0.12 and b₀^{*}: 1.7) was used as a standard.

2.6. Films formation

The films were produced by a casting technique in which three films were developed with the MP: with GA powder (F.GA), MD powder (F.MD) and GA/MD powder (F.GA/MD). Film-forming solutions were prepared with a suspension of cassava starch (Stival, Brazil) and glycerol (Dinamica, Brazil). The solutions were kept at 80 °C for 5 minutes with constant stirring in a water bath (De Leo B450) to promote starch gelatinization. The gelatinized solution was cooled to 40° C, and then the MPs were added.

Films were prepared by weighing an amount of film solution that provided 0.02 g/cm² of solids (which comprise starch and MP) on an acrylic plate resting on a leveled surface. A fixed proportion of starch:MP was utilized (0,625:1). Preliminary tests made with different concentrations of glycerol indicated that formulations containing gum arabic required extra glycerol; otherwise, the films would easily break when peeled from the plates. This explains the different proportions of glycerol used in each formulation (25,2%; 22%; 15,4% in F.GA, F.GA/MD and F.MD, respectively) relative to the solids. The films were dried in an oven with forced air circulation (DeLeo B5AFD) at 40 °C for 7 hours and conditioned at 25 °C and 58% RH in desiccators for 24 h prior to analysis, when they were peeled off the plates.

2.7. Films characterization

2.7.1. Mechanical properties

Before analysis, the films were stored for 48 h under conditions of controlled moisture (58% RH) and temperature (25°C). The films were cut into strips (70 mm - 25 mm), and the strip thickness was measured using a micrometer (MDC-25, Mitutoyo Corp, Japan, precision 0,001 mm, resolution / 0 mm ~ 25 mm) at five random positions on each strip. A texture analyzer (TA.XT2i e Stable Micro Systems, UK) with a load cell of 5 kg and an A/TGT self-tightening roller grips fixture was used to evaluate the percentage elongation at break (E) and the tensile strength at break (TS). These parameters were determined from stress–strain curves obtained from uniaxial tensile tests to film failure and were calculated according to the ASTM D882 standard method. The strips were mounted individually between the grips of the equipment with an initial grip separation of 50 mm and a test speed of 0.8 mm·s⁻¹. At least 10 replications of each test sample were run

2.7.2. Water vapor permeability

Water vapor permeability (WVP) was determined gravimetrically according to the method described by Talja et al. (2008) with some modifications. The samples were placed in permeation cells (inner diameter: 63 mm, height: 25 mm) that were filled with anhydrous CaCl₂ and covered with the sample; the cells were then hermetically sealed. The permeation cells were placed in a glass chamber with saturated sodium chloride solution, providing RH gradients of 0/74% at 25 °C. The mass gain of the cell permeation was determined by weighing the cell on an analytical balance (AY 220, Shimadzu) after 24 hours. The water vapor permeability of the samples was determined in triplicate using eq. 3.

$$WVP = \frac{w \cdot L}{A \cdot T \cdot \Delta p} \quad (3)$$

where 'w' is the weight of water permeated through the film (g), 'L' is the thickness of the film (m), 'A' is the permeation area (m²), T is the time of permeation (s), and 'Δp' is the water vapor pressure difference (at 25 °C) between the two sides of the film (Pa).

2.7.3. Opacity

The opacity of the films was determined by measuring their absorbance spectra at 600 nm using a UV spectrophotometer (Shimadzu UV-1800). The films were cut into rectangle pieces and directly placed in a spectrophotometer test cell. An empty quartz test cell was used as the reference. The opacity of the films was calculated, dividing the values of absorbance by the thickness of the film (mm) (Wang et al 2013)

2.7.4. Effect of films on retardation of sunflower oil oxidation

The films were wrapped to form bags (100 mm x 75 mm) to which 15 mL of sunflower oil was added, and the films were sealed and placed into a camera. Experiments were performed for 9 days under the following conditions: 40 °C, exposure to fluorescent lights with an intensity of 900-1000 lux and a relative humidity of 54 %, which results in an accelerated environment of degradation. The peroxide value (PV) of the samples was determined according to the IUPAC method on days 0, 3, 6 and 9. An open glass Petri dish containing sunflower oil was used as control. The samples were evaluated in triplicate.

2.8. Films and MP surface characteristics

The surface morphology of MP and films was observed under a scanning electron microscope (SEM) (Model JSM 6060, JEOL). The samples were fixed on aluminum stubs, coated with gold and scanned with an accelerating voltage of 5.0 kV and a magnification of 500x.

2.9. Statistical Analysis

The results were evaluated by analysis of variance (ANOVA) and a Tukey test at significance level of 5% ($P < 0.05$) using the software Statistica 12.0. (STATSOFT Inc.), corresponding to the average of three replicates ($n = 3$) \pm standard deviation.

3. Results and Discussion

3.1. Anthocyanins retention and Microencapsulation Efficiency

Comparing the amount of individual anthocyanins from the pomace extract to the MP, the freeze-drying process showed no significant reduction for most of the analyzed compounds, where malvidin-3-glucoside was the major anthocyanin in the extract (4601 mg / kg db), showing a retention between 92.16% and 97.78%. The AR of total anthocyanins when gum arabic and maltodextrin were used as wall materials was 91.49%, and no significant difference was observed compared to the other powders (Table 1). These results show similar ARs compared to studies in which the encapsulation of anthocyanins was performed by spray dryer: Tonon et al. (2008) obtained ARs of approximately 77–86% from *açaí* (*Euterpe oleracea*) juice, Silva et al. (2013) obtained ARs of 79-100% from *jaboticaba* (*Myrciaria cauliflora*) extracts, and Souza et al. (2015) obtained ARs of 88–97% from *Bordo* grape (*Vitis vinifera*) wine pomace.

Microencapsulation efficiency (ME) refers to the potential of the wall material to encapsulate or hold the core material inside the microcapsule. Encapsulation efficiencies are also related to the shelf life of the anthocyanin content in the powder (Idham, Muhamad, Sarmidi, 2012). In this study, the usage of different wall materials did not cause differences in the AR and ME, where the three formulations presented a high percentage (above 88%) of ME, indicating the largest portion of the anthocyanins is located inside the core of the capsules, while the minority is on its surface. Many authors have studied the usage of maltodextrin and gum arabic as wall materials to encapsulate anthocyanins (Idham, Muhamad, Sarmidi, 2012; Souza

Table 1. Quantification of anthocyanins in wine grape pomace extract, anthocyanins retention (AR) on microencapsulated powders and the respective microencapsulation efficiency obtained on each powder.

	Pomace Extract	AR (%)		
	(mg/100 g db)	GA	MD	GA/MD
Delphinidin-3-glucoside	704.04 ± 122.69	28.86	78.25	73.92
Malvidin-3-glucoside	4601.08 ± 94.10	97.78	92.16	97.31
Cyanidin-3-glucoside	186.74 ± 12.89	7.84	14.39	14.35
Petunidin-3-glucoside	0.04 ± 0.00	92.56	88.56	99.92
Total Anthocyanins (AT)	5491.90 ± 229.68	85.88 a	87.73 a	91.49 a
Microencapsulation Efficiency (%)		89.50 a	87.99 a	89.61 a

The analyses were performed in three replicated samples. Values expressed as the mean ± standard deviation. Different superscript letters in the same line indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between the treatments.

et al., 2015; Silva et al., 2013), and there is no conclusive information about the best materials to optimize the AR and ME of anthocyanins. The concomitant usage of these materials was more frequently reported as one of best choices, although the disagreement of results found in many studies demonstrates the complexity that involves the encapsulation of these compounds.

3.2. ABTS, solubility and moisture of the Microencapsulated Powders

The GA powder showed the highest antioxidant activity (Table 2), followed by GA/MD and MD powders. Because Rodrigues et al. (2012) suggested antioxidant properties of gum arabic, the present study analyzed the antioxidant activity of Empty MP. However, no significant difference between the wall materials was verified concerning this property (2.2 ± 0.1 , 2.0 ± 0.2 and 1.8 ± 0.1 Trolox equivalents per gram of Empty GA, Empty MD and Empty GA/MD, respectively).

Table 2. ABTS (1 M trolox/g MP), solubility and moisture of powders microencapsulated with different wall materials

	ABTS	Solubility (%)	Moisture (%)
GA	31.3 ± 1.3 a	83.19 ± 1.56 a	3.63 ± 0.15 b
MD	12.8 ± 1.2 c	41.31 ± 0.41 b	10.98 ± 0.17 a
GA/MD	22.5 ± 1.4 b	90.55 ± 2.28 a	3.63 ± 0.10 b

The analyses were performed in three replicated samples. Values are expressed as the mean ± standard deviation. Different superscript letters in the same column indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between the treatments.

Considering that the powders showed similar AR and ME and that the wall materials utilized presented the same antioxidant activity, no difference between the antioxidant properties of the powders was expected. However, GA presented higher antioxidant activity than the other powders. Once the ABTS was measured in water, the solubility of the powder in water became an important parameter, as the release of encapsulated anthocyanins is highly dependent on the dissolution of the wall material (Berg et al, 2012). Because GA and GA/MD presented higher solubility in water (Table 2), it is possible to suggest that higher amounts of anthocyanins were released in water when these materials were used as wall materials, promoting a higher antioxidant activity of the capsules in the aqueous environment.

3.3. Color stability of powders

During 42 days of storage (25 °C, packaged under vacuum and protection from light), the most affected parameter was a^* , where positive values are an indication of the red tonality (Table 3). The powders all presented a high value of a^* , which can be attributed to a high anthocyanin content (Jiménez-Aguilar et al., 2011). This parameter remained stable during 21 days to all MP, suggesting that the encapsulation with GA, MD and GA/MD promoted the stability of anthocyanins during this period. The three formulas of MP analyzed showed a reduction of this parameter after 42 days, which demonstrates a loss of red color related to the anthocyanins degradation. The decrease in the parameter a^* was also reported by Idham et al. (2012), who evaluated the color stability of anthocyanins encapsulated with gum

arabic, maltodextrin and starch during storage at 4, 25 and 37°C in the absence of light, and Souza et al. (2015), who evaluated color stability of anthocyanins encapsulated with different concentrations of maltodextrin during storage at 25°C, 38% RU, without protection from light.

Except for some fluctuations, an increase in lightness (L^*) was observed in all powders. The increase of parameter L^* during the storage of encapsulated anthocyanins has been found in other studies, where is interpreted as an indication of discoloration due to degradation of anthocyanins (Jiménez-Aguilar et al., 2011).

Only MD suffered a reduction in parameter b^* (a decrease in b^* is related to the loss of blue), while the other powders presented oscillating values of this parameter. According to Schwartz et al (2010), malvidin-3-glucosideo, the major anthocyanin found in this study, is the anthocyanin contributing the most to the blue color; hence, the decrease in b^* would indicate its degradation.

3.4. Films characterization

The film properties are presented in Table 4, where the three formulations presented the same measure of thickness. The film formed with MD (F.MD) presented the lowest opacity, indicating a higher transparency of films and thus a less protective barrier against light.

One of the main functions of a film for food packaging is often to impede moisture transferring between food and the surrounding atmosphere, so the WVP of the film should be as low as possible (Wang et al., 2015). Comparing the films developed in this study, F.MD presented the lowest water vapor permeability, which also had lower moisture (Table 4). The rate of migration of water molecules in a biopolymer film decreases with a decrease in the size of the biopolymers in a film matrix due to an increase in the tortuosity of the pathway of water molecules (Kim et al., 2012). This resulted in a decrease of WVP in the film made with maltodextrin (F.MD) because maltodextrin DE 20 presents smaller particle size than gum arabic. Additionally, the lower WVP and moisture can be attributed to the lower percentage of glycerol used during F.MD formulation, which was 15.4% (related to solids),

Table 3. Color stability of powders microencapsulated with gum arabic (GA), maltodextrin (MD) and gum arabic:maltodextrin (GA/MD), packaged under vacuum and protection from light, kept at 25 °C.

Treatment	DAY 0	21 DAYS	42 DAYS
Parameter L			
GA	72.22 ± 0.22 ^b	69.51 ± .43 ^c	90.25 ± 0.32 ^a
MD	70.26 ± 0.56 ^c	66.92 ± 1.99 ^b	89.98 ± 0.99 ^a
GA/MD	73.43 ± 1.09 ^b	70.87 ± 0.50 ^c	88.88 ± 0.59 ^a
Parameter a*			
GA	13.15 ± 0.21 ^a	13.14 ± 0.74 ^a	3.50 ± 0.52 ^b
MD	21.21 ± 0.94 ^a	19.66 ± 1.39 ^a	7.41 ± 0.37 ^b
GA/MD	16.39 ± 0.32 ^a	16.91 ± 0.57 ^a	6.12 ± 0.15 ^b
Parameter b*			
GA	8.29 ± 0.08 ^b	9.24 ± 0.50 ^a	7.87 ± 0.37 ^{ab}
MD	5.61 ± 0.33 ^a	6.74 ± 0.45 ^a	4.94 ± 0.74 ^b
GA/MD	6.17 ± 0.17 ^b	6.86 ± .024 ^a	6.62 ± 0.16 ^{ab}

The analyses were performed in three replicated samples. Values are expressed as the mean ± standard deviation. Different superscript letters in the same column indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between the treatments.

compared to 25.2% in F.GA and 22% in F.GA/MD. The presence of glycerol, a hydrophilic plasticizer, favors water molecule adsorption (Yoshida et al., 2003), thus provoking a higher WVP on the formulations containing higher concentrations of this component (Müller et al., 2008). The WVP results found on the present study were lower than cassava starch-based films ($40 \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1} \times 10^{-11}$) and starch-polyethylene films ($120 \text{ to } 220 \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1} \times 10^{-11}$), and comparable to cassava starch-based film with bentonite nanoparticles ($8.3 \text{ to } 40 \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1} \times 10^{-11}$) (Jiménez et al., 2012).

In the present study, the film formulation with better resistance (higher TS) was obtained when MD powders were used (F.MD); thus, it is possible to presume that the usage of gum arabic has weakened other formulations (F.GA and F.GA/MD) as can be observed at Table 4. The high addition of gum arabic in films has been reported to reduce the intermolecular force between the chains of adjacent macromolecules and, consequently, to reduce the tensile strength (LI et al., 2015). Additionally, the presence of glycerol is related to a reduction in tensile strength due to the decrease in intermolecular interactions between film matrix molecules, which can explain the lower tensile strength from the formulations F.GA and F.GA/MD (Table 4). These results are similar to those from the study of Souza et al. (2012), where the addition of glycerol caused a decrease in TS in cassava starch films.

Table 4. Thickness, water vapor permeability (WVP), moisture, opacity, tensile strength (TS) and elongation of films produced with anthocyanins encapsulated with different wall materials: gum arabic (F.GA), maltodextrin (F.MD) and gum arabic:maltodextrin (F.GA/MD).

	Thickness (mm)	Opacity	WVP ¹	Moisture (%)	TS (MPa)	Elongation (%)
F.GA	0.149±0.015 ^a	1.9±0.2 ^a	14.8±0.8 ^a	12.5±0.6 ^a	0.14±0.02 ^b	12.1±0.5 ^b
F.MD	0.140±0.006 ^a	0.7±0.0 ^b	5.9±0.5 ^b	10.7±0.4 ^b	0.75±0.11 ^a	124.2±10.8 ^a
F.GA/MD	0.146±0.017 ^a	1.8±0.2 ^a	14.0±0.5 ^a	11.6±0.4 ^{ab}	0.15±0.01 ^b	104.1±11.1 ^a

The analyses were performed in at least three replicated samples. Values expressed as the mean ± standard deviation. Different superscript letters in the same column indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between the treatments.

¹ Represented in $[g \cdot m^{-1} \cdot s^{-1} \cdot Pa^{-1} \times 10^{-11}]$.

Considering that mechanical properties may vary with specimen thickness, method of preparation, speed of testing, type of grips used, and manner of measuring extension (Souza et al., 2012) it is difficult to compare these properties with literature data. Despite these difficulties, F.MD resistance is comparable with those reported in literature for biodegradable films, whereas F.GA and F.GA/MD presents low TS results.

Elongation (%) represents the maximum change in length of the test specimen before breaking, thus reflecting the ability of films to strain and adapt into packaged products. The formulations containing maltodextrin (F.MD and F.GA/MD) presented outstanding elongation ability (higher than 100%) when compared with other biodegradable films. This property can be attributed to the plasticization effect caused by the higher mobility promoted by the relatively low molecular weight of maltodextrins (Embuscado, Huber, 2009) combined with the usage of glycerol.

3.5. *Effect of films on retardation of sunflower oil oxidation (PV)*

The peroxide index (PV) was used to monitor the effect of the films on the oxidation of sunflower oil. Figure 1 shows the evolution of this index for the different samples over time. Once all samples exceeded the limit of 10 meq peroxides/kg (maximum value permitted by Brazilian legislation to oil commercialization), the test was suspended.

Edible films and coatings that include antioxidant agents in their formulation protect food both by the antioxidant effect of compounds and by the air barrier they represent, which results in a better preservation of quality (Bonilla et al., 2012). Because oils and fats are easily broken down during storage, the PV tends to increase during early stages of oxidation when the formation rate of hydroperoxides is higher than the rate of decomposition (Pereira et al., 2010). The control sample, which was not coated and thus was directly exposed to the air and light, reached 65.8 meq peroxides/kg after 3 days of storage, while the samples coated with films presented lower values (28.7, 18.5 and 4.7 meq peroxides/kg to F.GA, F.GA/MD and F.MD, respectively). Regarding the established PV limit, only oil samples protected with F.MA were appropriate to consume after 3 days, being under the limit until the 6th day of accelerated storage environment. Considering the protective effect of films on sunflower oil, F.MD showed the best results, where it reduced the rate of the primary oxidation process and therefore kept the oil in appropriate conditions for commercialization for a longer time. Upon exposing sunflower oil to light and heat, the peroxide values obtained showed that the films actively protected the oil.

A later decrease in PV is expected as a result of the lower substrate availability and the instability of peroxide molecules, which leads to a formation rate lower than that of decomposition (Pereira et al., 2010). The increase and subsequent decrease in the PV value observed in F.GA and F.GAMD samples are a consequence of lower substrate availability, which limited formation of new peroxides. During the time analyzed, this behavior was not observed at the control sample because its direct exposure to the air allows an abundant substrate availability that induces a high formation rate of new hydroperoxides.

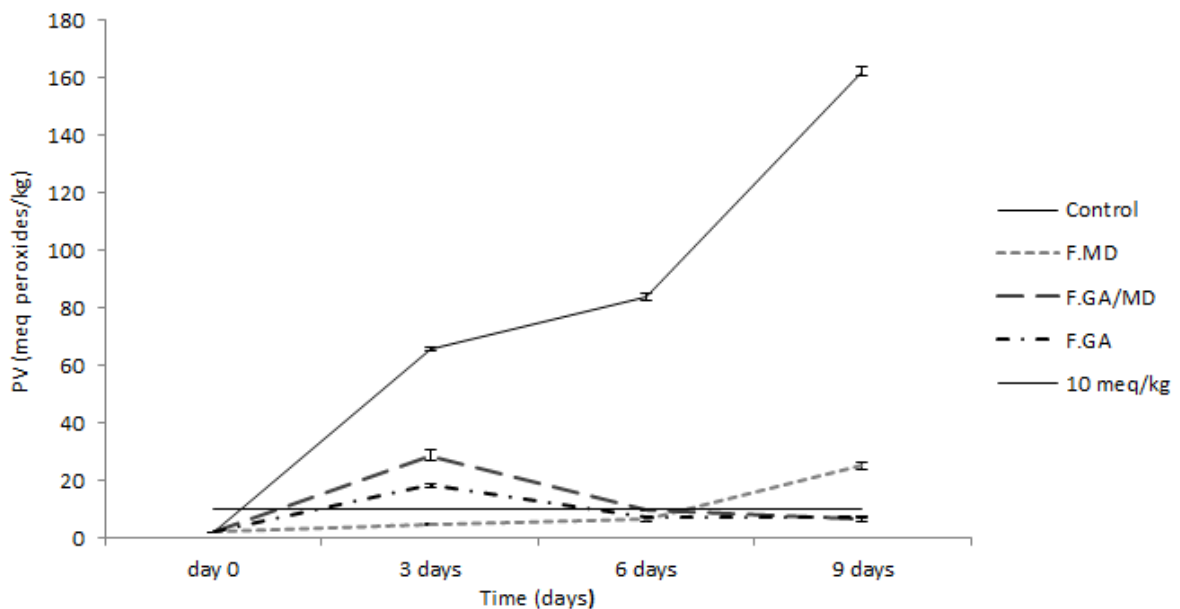


Figure 1: Effect of films with anthocyanins encapsulated with maltodextrin (F.MD), gum arabic (F.GA) and gum arabic:maltodextrin (F.GA/MD) on sunflower oil oxidation at 40 °C, 54% RH and 950±50 lux of luminosity, measured by peroxide formation over time. An open glass Petri dish containing sunflower oil was used as Control

3.6 Surface characteristics powders and film

The analysis of the surface of MP particles obtained with different encapsulating agents and the films obtained from them was performed using SEM. The MPs (Figure 2: a, b, c) showed smooth surfaces and irregular, flake-like structures of different sizes, eventually forming aggregates, which was expected

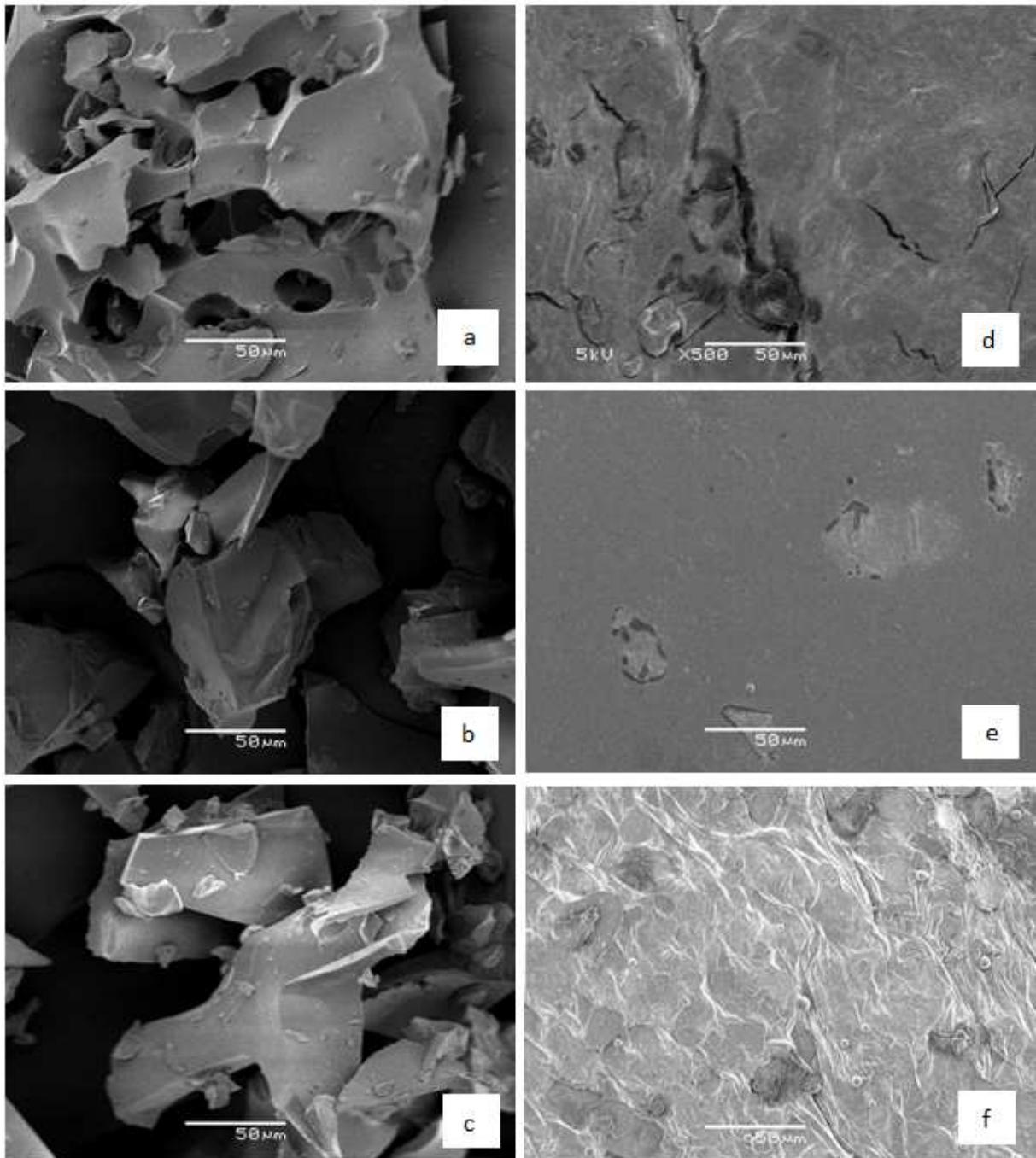


Figure 2: SEM surface morphologies of microencapsulated powder particles (a, b, c) and films (d, e, f) with a magnification of 500x. a - GA particles; b - MD particles; c – GA/MD particles; d – film made with GA (F.GA); e - film made with MD (F. MD); f – film made with GA/MD (F.GA/MD).

because the powders were freeze-dried and ground in mortar (Gurak, Cabral, Rocha-Leão, 2013). Figure 2b shows that maltodextrin was the encapsulating agent that enabled the formation of capsules with fewer wrinkles on their surfaces, which is in

accord with the research of by Silva et al. (2014). The adherence of small particles to the surface of larger particles was observed in the three treatments, which was also observed in the studies of Cano-Chauca et al. (2005) and Silva et al. (2014).

On the film's surface (Fig 2: d, e, f), it is possible to observe that the particles were partially dissolved in the films, where small dispersed fractions can be visualized. Films made with maltodextrin (Fig 2e) enabled the formation of a smoother surface with fewer wrinkles, which can be explained by the lower molecular weight of maltodextrin in comparison with gum arabic, thus forming a denser structure. F.GA presented an irregular surface with some disruptions, what helps to clarify its poor mechanical properties.

4. Conclusions

The wall materials utilized in this study showed effectiveness in encapsulating the anthocyanins extracted from wine grape pomace, achieving up to 91.5% of anthocyanin retention and 89.6% of microencapsulation efficiency, where no difference was found between the treatments. A higher antioxidant activity was found in GA powders, which was attributed to its higher solubility in water and consequent liberation of anthocyanins to the aqueous environment. Films prepared with the different microencapsulated powders showed different mechanical properties, and films made with MD powder (F.MD) presented the best results for tensile strength and a high elongation. The F.MD also presented a higher protective effect on peroxide formation in sunflower oil, which makes maltodextrin a promising material for the acquisition of films with satisfactory mechanical properties endowed with encapsulated anthocyanins. Further research will be conducted in order to understand the mechanism of release of anthocyanins from films and its activity on reducing the presence of radical oxidative species in food.

Acknowledgments

The authors are grateful to CAPES and CNPq for the financial support provided for this research, and Eletronic Microscope Center (CME) of Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) for technical assistance. The authors thankfully

acknowledge Vanmarino winery, from Rio Grande do Sul, Brazil, for supplying the raw material.

Reference list

Anderson, R. A. (1982). Water absorption and solubility and amylograph characteristics of roll-cooked small grain products. *Cereal Chemistry (USA)*, 59, 265–269.

Association of Official Analytical Chemists (2006). *Official methods of analysis*. (18th ed.). Maryland: AOAC.

Berg, S., Bretz, M., Hubbermann, E. M., & Schwarz, K. (2012). Influence of different pectins on powder characteristics of microencapsulated anthocyanins and their impact on drug retention of shellac coated granulate. *Journal of Food Engineering*, 108(1), 158-165.

Bodaghi, H., Mostofi, Y., Oromiehie, A., Zamani, Z., Ghanbarzadeh, B., Costa, C., Conte, A., & Del Nobile, M. A. (2013). Evaluation of the photocatalytic antimicrobial effects of a TiO₂ nanocomposite food packaging film by in vitro and in vivo tests. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 702-706.

Bonilla, J., Atarés, L., Vargas, M., & Chiralt, A. (2012). Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations. *Journal of Food Engineering*, 110(2), 208-213.

Cano-Chauca, M., Stringheta, P. C., Ramos, A. M., & Cal-Vidal, J. (2005). Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(4), 420-428.

Davidov-Pardo, G., Arozarena, I., & Marín-Arroyo, M. (2013). Optimization of a Wall Material Formulation to Microencapsulate a Grape Seed Extract Using a Mixture Design of Experiments. *Food and Bioprocess Technology*, 6(4), 941-951.

Embuscado, M. E., & Huber, K. C. (2009). *Edible films and coatings for food applications*: Springer.

Flores, S., Famá, L., Rojas, A. M., Goyanes, S., & Gerschenson, L. (2007). Physical properties of tapioca-starch edible films: Influence of filmmaking and potassium sorbate. *Food Research International*, 40(2), 257-265.

Fontana, A. R., Antonioli, A., & Bottini, R. (2013). Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(38), 8987-9003

- Fraige, K., Pereira-Filho, E. R., & Carrilho, E. (2014). Fingerprinting of anthocyanins from grapes produced in Brazil using HPLC–DAD–MS and exploratory analysis by principal component analysis. *Food Chemistry*, *145*, 395-403.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, *40*(9), 1107-1121.
- Gomez-Estaca, J., Lopez-de-Dicastillo, C., Hernandez-Munoz, P., Catala, R., & Gavara, R. (2014). Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, *35*(1), 42-51.
- Gurak, P. D., Cabral, L. M. C., & Rocha-Leão, M. H. (2013). Production of grape juice powder obtained by freeze-drying after concentration by reverse osmosis. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *56*(6), 1011-1017.
- Idham, Z., Muhamad, I. I., & Sarmidi, M. R. (2012). Degradation kinetics and color stability of spray-dried encapsulated anthocyanins from hibiscus sabdariffa L. *Journal of Food Process Engineering*, *35*(4), 522-542.
- Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2012). Edible and biodegradable starch films: a review. *Food and Bioprocess Technology*, *5*(6), 2058-2076.
- Jiménez-Aguilar, D. M., Ortega-Regules, A. E., Lozada-Ramírez, J. D., Pérez-Pérez, M. C. I., Vernon-Carter, E. J., & Welti-Chanes, J. (2011). Color and chemical stability of spray-dried blueberry extract using mesquite gum as wall material. *Journal of Food Composition and Analysis*, *24*(6), 889-894.
- Júnior, A., Fronza, N., Foralosso, F., Dezen, D., Huber, E., dos Santos, J., Machado, R., & Quadri, M. (2015). Biodegradable Duo-functional Active Film: Antioxidant and Antimicrobial Actions for the Conservation of Beef. *Food and Bioprocess Technology*, *8*(1), 75-87.
- Kim, I.-H., Yang, H.-J., Noh, B.-S., Chung, S.-J., & Min, S. C. (2012). Development of a defatted mustard meal-based composite film and its application to smoked salmon to retard lipid oxidation. *Food Chemistry*, *133*(4), 1501-1509.
- Li, C., Zhu, W., Xue, H., Chen, Z., Chen, Y., & Wang, X. (2015). Physical and structural properties of peanut protein isolate-gum Arabic films prepared by various glycation time. *Food Hydrocolloids*, *43*(0), 322-328.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science & Technology*, *41*(1), 1-21.
- Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Ghorbani, M., & Assadpoor, E. (2014). Spray-drying microencapsulation of anthocyanins by natural biopolymers: A review. *Drying*

technology, 32(5), 509-518.

Melo, P. S., Massarioli, A. P., Denny, C., dos Santos, L. F., Franchin, M., Pereira, G. E., Vieira, T. M. F. d. S., Rosalen, P. L., & Alencar, S. M. d. (2015). Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. *Food Chemistry*, 181(0), 160-169.

Müller, C. M. O., Yamashita, F., & Laurindo, J. B. (2008). Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. *Carbohydrate Polymers*, 72(1), 82-87.

Pereira de Abreu, D. A., Losada, P. P., Maroto, J., & Cruz, J. M. (2010). Evaluation of the effectiveness of a new active packaging film containing natural antioxidants (from barley husks) that retard lipid damage in frozen Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Food Research International*, 43(5), 1277-1282.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231-1237.

Rodrigues, E., Mariutti, L. R. B., Faria, A. F., & Mercadante, A. Z. (2012). Microcapsules containing antioxidant molecules as scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry*, 134(2), 704-711.

Saéenz, C., Tapia, S., Chávez, J., & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114(2), 616-622.

Schwartz, S.J., Von Elbee, J.H., Giusti, M.M., (2010). Corantes. In: Damodaran, S., Parkin, K.L., Fennema, O.R. (Eds.), *Química de Alimentos de Fennema*, 4th ed. Artmed, Porto Alegre, pp.445–498

Silva, P. I., Stringheta, P. C., Teófilo, R. F., & de Oliveira, I. R. N. (2013). Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 538-544.

Silva, V. M., Vieira, G. S., & Hubinger, M. D. (2014). Influence of different combinations of wall materials and homogenisation pressure on the microencapsulation of green coffee oil by spray drying. *Food Research International*, 61(0), 132-143.

Shahidi, F., & Han, X. Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 33(6), 501-547.

Souza, A. C., Benze, R., Ferrão, E. S., Ditchfield, C., Coelho, A. C. V., & Tadini, C. C.

(2012). Cassava starch biodegradable films: Influence of glycerol and clay nanoparticles content on tensile and barrier properties and glass transition temperature. *LWT - Food Science and Technology*, *46*(1), 110-117.

Souza, V. B., Thomazini, M., Balieiro, J. C. d. C., & Fávaro-Trindade, C. S. (2015). Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*). *Food and Bioproducts Processing*, *93*(0), 39-50.

Srivastava, J., & Vankar, P. S. (2010). *Canna indica* flower: New source of anthocyanins. *Plant Physiology and Biochemistry*, *48*(12), 1015-1019.

Talja, R. A., Helén, H., Roos, Y. H., & Jouppila, K. (2008). Effect of type and content of binary polyol mixtures on physical and mechanical properties of starch-based edible films. *Carbohydrate Polymers*, *71*(2), 269-276.

Tanon, V., Brabet, C., Hubinger, M. D. (2008). Influence of process conditions on the physicochemical properties of acai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering* *88*(3), 411-418.

Tsuda, T., Shiga, K., Ohshima, K., Kawakishi, S., & Osawa, T. (1996). Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Biochemical Pharmacology*, *52*(7), 1033-1039.

Van Acker, S. A. B. E., Van Den Berg, D.-j., Tromp, M. N. J. L., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J. F., & Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, *20*(3), 331-342.

Wang, L., Dong, Y., Men, H., Tong, J., & Zhou, J. (2013). Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. *Food Hydrocolloids*, *32*(1), 35-41.

Wang, Q., Tian, F., Feng, Z., Fan, X., Pan, Z., & Zhou, J. (2015). Antioxidant activity and physicochemical properties of chitosan films incorporated with *Lycium barbarum* fruit extract for active food packaging. *International Journal of Food Science & Technology*, *50*(2), 458-464.

Yoshida, C. M. P., Antunes, A. C. B., Antunes, L. J., & Antunes, A. J. (2003). An analysis of water vapour diffusion in whey protein films. *International Journal of Food Science & Technology*, *38*(5), 595-601.

Yousuf, B., Gul, K., Wani, A. A., & Singh, P. (2015). Health Benefits of Anthocyanins and Their Encapsulation for Potential Use in Food Systems: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 00-00.

Zuidam, N. J., & Shimoni, E. (2010). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing* (p. 3-29). Springer: New York.

ARTIGO 2

Application of active biodegradable film with encapsulated anthocyanins on oil pouches – effect on extra-virgin olive oil quality during storage.

ABSTRACT

Extra-virgin olive oil has gained worldwide acceptance by consumers looking for natural, nutritious and healthy foods, since it is a non-refined oil rich in monounsaturated fatty acids with proven health benefices, what turns it in a product with unique composition with high nutritional value. Despite of its many qualities, extra-virgin olive oil is highly sensitive to oxidation. The aim of this study was to verify the effectiveness of the usage of an active biodegradable film endowed with encapsulated anthocyanins on maintaining the oil quality under a thermal and photo-oxidative environment of degradation. Microcapsules were produced with anthocyanins extracted from wine grape pomace and maltodextrin was used as wall material. The produced biodegradable film was characterized and used to produce pouches of extra-virgin olive oil. Oil pouches were kept under accelerated oxidation conditions (40° C and light) for 12 days. The oil packaged in the produced film presented better oxidation stability when compared to the one packaged with a commercial polypropylene. The produced film, which was proven to be biodegradable (96% of weight loss in 10 days), maintained the extra-virgin olive oil under the quality limits of peroxides, K_{232} and acidity established by Codex Alimentarius for twice as long as the oil packaged with polypropylene. Carotenoids, chlorophylls and oil color were also analyzed and a similar degradation was observed between the treatments.

Keywords: extra-virgin olive oil; Maltodextrin; biodegradable films; anthocyanins

1. Introduction

Extra-virgin olive oil (EVOO) is obtained from olives solely by mechanical or other physical processes. The presence of natural antioxidant components such as carotenoids, chlorophylls and tocopherol is a typical characteristic of EVOO, once these components are removed from other vegetable oils that are generally submitted to refining processes (RIZZO et al., 2014). Other important characteristic of EVOO is the predominance of monounsaturated fatty acids over the saturated ones, which have positive results in the increase of HDL (High-Density Lipoproteins) and reduction of LDL (Low-Density Lipoproteins) oxidation (PISCOPO, POIANA, 2012).

The importance of EVOO is well known because it is one of the principal component of the Mediterranean diet, appreciated for the health benefits that have been demonstrated to be related to the protection against chronic and degenerative diseases, different tumors and ageing (SERVILLI et al., 2004). Due to its unique composition, nutritional value, and health benefits, olive oil has gained worldwide acceptance by ever-more-conscious consumers seeking nutritious, natural, and healthy foods (ANGEROSA et al., 2004).

Similar to other products that are produced within a limited period of time but consumed throughout the year, olive oil must be stored, and these storage and packaging conditions will determine the commercial life of the olive oil (NIERAT et al., 2014). As in any other fat-containing product, rancidity of edible oil due to oxidative degradation is a serious problem. Because oxidation rate in vegetable oils depends on a number of factors including the availability of oxygen, presence of light and temperature (PRISTOURI, BADEKA, KONTOMINA, 2010), the oil exposure to such factors during their storage greatly influence the way that oxidation progresses and consequently, its acceptance by the consumers (KANAVOURAS, HERNANDEZ-MUNOZ, COUTELIERIS, 2006).

Auto-oxidation, that is oxidation in the absence of light, follows a free radical mechanism where initially absorption of oxygen results in the formation of hydroperoxides (PRISTOURI, BADEKA, KONTOMINA, 2010). When vegetable oils

are exposed to light, photo-oxidation occurs through the action of natural photosensitizers (i.e. chlorophyll), which react with triplet oxygen to form the excited state singlet oxygen. Singlet oxygen then forms a free radical from unsaturated fatty acids leading to the production of hydroperoxides and eventually to carbonyl compounds resulting to the development of undesirable flavors in oils (CHOE, MIN, 2006).

The increased demand for olive oils of high quality challenges the development of packaging materials that maintains EVOO properties for a longer period, once packaging can directly influence olive oil quality by protecting the product from both oxygen and light (KANAVOURAS et al., 2004). Materials which have been used for olive oil packaging, which are mainly sold in bottles, include glass, metals and more recently plastics (PRISTOURI, BADEKA, KONTOMINA, 2011; RIZZO et al., 2014).

In the past few years, there was an increased interest in developing environmentally friendly packaging, as those are produced from renewable resources and are an attractive alternative to substitute synthetic and non-biodegradable plastics (CARPINÉ et al., 2015; IAHNKE et al., 2015). Polysaccharides, proteins and lipids, employed separately or in combination, are the main materials used to produce biodegradable packaging materials, edible films and coatings (DAVIS, SONG, 2006).

Considering that oxidation is one of the main causes of food spoilage, several natural antioxidants have been incorporated into biodegradable films in order to promote greater stability to lipid oxidation of fatty products and to extend the shelf-life of highly perishable products. (GOMEZ-ESTACA et al., 2014).

Antioxidants can prevent or delay oxidation by scavenging free radicals, quenching singlet oxygen, inactivating peroxides and other reactive oxygen species, quenching secondary oxidation products, inhibiting pro-oxidative enzymes, among others (SAHIDI, ZHONG, 2007). With respect to antioxidant effectiveness in lipid media, the “polar paradox theory” states that polar antioxidants are more effective in less polar media, such as bulk oils, while nonpolar antioxidants are more effective in relatively more polar media, such as oil-in-water emulsions (PORTER, 1993).

Concerning the increased on demand for sustainable sources of natural bioactive ingredients, the obtention of anthocyanins that remains on grape pomace

after wine making process can be a good alternative to the incorporation of antioxidants into food packaging (STOLL et al., 2015). Anthocyanins, one of the largest and most widespread groups of plant constituents, have been described as effective scavengers of reactive oxygen species, thus avoiding the propagation of new free radical species which catalyze lipid oxidation (VAN ACKER et al., 1996). Since the incorporation of anthocyanins into food and medical products is a challenging task due to their low stability, encapsulation is an efficient way to introduce such compounds into these products (YOUSUF et al., 2015).

Integrating olive oil as a dressing and condiment is mentioned as a good way to benefit people's health (HUANG, SUMPIO, 2008), hence the application of an active biodegradable film on the obtention of olive oil pouches is of a great interest, constituting in an eco-friendly and sustainable way to bring health and practicality to consumers.

The present study aims to verify the effectiveness of the usage of an active biodegradable film endowed with encapsulated anthocyanins on maintaining the quality of a commercial EVOO.

2. Materials and methods

2.1 Microcapsules obtention

2.1.1 Preparation of grape pomace extracts

The Cabernet Sauvignon grape pomace (2013-2014 vintage) derived from the wine-making process was provided by Vanmarino Winery (Pinto Bandeira - RS) and was used as source of anthocyanins. The seeds were manually removed, and the skins and the remainder of the pulp were stored at -18 °C until the time of analysis. The procedure of Srivastava and Vankar (2010) with modifications was followed to the obtention of anthocyanin extracts, which was performed using a hydroalcoholic solvent composed of 70% ethanol, acidified with HCl (0.1%), in a proportion of 1:80 (w/v) (grape pomace:solvent). The food grade extraction occurred in two stages of one hour each in a water bath (40° C) under stirring and protected from light.

2.1.2 Microcapsules formation

The freeze-drying process (Freeze-Dryer Liotop, L101, Brazil) was used to microencapsulate the extracted compounds. Extracts were concentrated in a Fisatom rotaevaporator (M802, Brazil) at ≤ 40 °C achieving one-tenth of the original extract volume, when a solution of 30% (w/v) Maltodextrin DE 20 (Vallen, Brazil) was added. The samples were freeze-dried for 72 hours under protection from light, manually macerated and sieved (mesh 35).

2.1.3 Anthocyanin content

High efficiency liquid chromatography (HPLC) was used to quantify the encapsulated anthocyanins. The sum of individual assessed anthocyanins was considered and expressed as malvidin equivalent.

For this analysis an HPLC chromatograph (Agilent 1100 Series, Santa Clara, CA, USA) equipped with a quaternary pump system solvent and a UV-visible detector was used with a C18 Shim-Pak CLC0DS column (5 microns, 250 x 4.6 mm). The mobile phase consisted of a linear gradient elution of 5% aqueous formic acid/methanol 85:15 (v/v) to 20:80 over 25 min, and this isocratic ratio was maintained for 15 minutes. The mobile phase flow was 0.8 mL/min, and the column temperature was maintained at 29 °C. The chromatograms were processed at a fixed wavelength of 520 nm.

Quantification was done by the external standard method. A standard curve was constructed with a malvidin-3-glucoside standard (CAS 7228-78-6, $\geq 90.0\%$) purchased from Sigma-Aldrich (USA), with the concentration range of 5–50 mg/mL. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 2.07×10^{-2} and 3.45×10^{-2} $\mu\text{g/mL}$, respectively.

2.2 Films formation

Film-forming solutions were prepared with a suspension of cassava starch (Stival, Brazil) and glycerol (Dinamica, Brazil). The solutions were kept at 80 °C for 5 minutes with constant stirring in a water bath (De Leo B450) to promote starch

gelatinization. The gelatinized solution was cooled to 40° C, and then the microcapsules were added. The film-forming solution, which consisted in 5%(w/v) cassava starch, 2%(w/v) glycerol, 8% (w/v) microcapsules and water, had its formulation chosen according to a previous work in which maltodextrin was shown as a promising material for the acquisition of films with satisfactory mechanical properties and protective effect on sunflower oil oxidation (STOLL et al., 2015). The films were produced by a casting technique by weighing an amount of film solution that provided 0.04 g/cm² of solids (which comprise starch and microcapsules) on an acrylic plate resting on a leveled surface. The films were dried in an oven with forced air circulation (DeLeo B5AFD) at 40 °C for 9 hours and conditioned at 25 °C and 58% RH in desiccators for 24 h prior to analysis, when they were peeled off the plates.

2.3 Films characterization

2.3.1 Thickness and mechanical properties

Films thickness was measured in triplicate, using a micrometer (MDC-25, Mitutoyo Corp, Japan, precision 0,001 mm, resolution / 0 mm ~ 25 mm) at five random positions on each film. The tensile strength (% TS) and elongation at break (% E) of the films were evaluated according to the ASTM D882 standard method. A texture analyzer (TA.XT2i e Stable Micro Systems, UK) with a load cell of 5 kg and an A/TGT self-tightening roller grips fixture was used to perform the analysis. Ten specimens were tested for each sample.

2.3.2 Moisture, water vapor permeability and solubility in water

To analyse film moisture, pre-weighed film samples were put into aluminium capsules and dried in an air-circulating oven at 105 °C for 24 h. The moisture value was determined as the percentage of initial film weight lost during drying and reported on wet basis. Water vapor permeability (WVP) was determined gravimetrically according to the method described by Talja et al. (2008). The film solubility was calculated as the percentage of dry matter of the film solubilized after

immersion for 24 h in water at 25 °C (GONTARD et al., 1994). Analyses were performed in triplicate.

2.3.3 Light transmission and transparency

The ultraviolet (UV) and visible light barrier properties of the film were measured at selected wavelengths from 200 to 700 nm using a UV spectrophotometer (Shimadzu UV-1800, Japan). Light transmission through a commercially available polypropylene (PP), a commonly used packaging film, was also measured for comparison. Films transparency were determined by measuring their transmittance spectra at 500 nm. An empty quartz test cell as control (TANG et al., 2005).

2.3.4 Biodegradability: Indoor soil burial degradation

The soil burial degradation test was performed according to the methodology described by Martucci and Ruseckaite (2009) with some modifications. A natural organic soil was used as the degradation environment for the films. The film samples were cut into rectangles (2 cm × 3 cm), dried at 60 °C until constant weight (m_0), and placed into an aluminum mesh, which were then buried at the depth of 5 cm from the surface of the organic soil contained in plastic boxes. Every two days, water was added to the soil to maintain the humidity at approximately 40%. The degree of degradation of the films was determined after 10 days as the weight loss (WL; %), by the equation:

$$WL(\%) = [(m_{10} - m_0) / m_0] \times 100$$

where m_0 is the initial mass and m_t is the remaining dried mass after 10 days.

2.4 Films and microcapsules surface characteristics

The film and microcapsules surface morphology were observed under a scanning electron microscope (SEM) (Model JSM 6060, JEOL). The samples were

fixed on aluminum stubs, coated with gold and scanned with an accelerating voltage of 5.0 kV and a magnification of 500x.

2.5 *Films application: pouches of EVOO*

Pouches were made in order to pack olive oil as a condiment that could be easily used in small portions. The EVOO from Alentejo, Portugal (crop 2013-2014), was bought at a local market. First, the biodegradable films with anthocyanins (FA film) were cut and heat sealed in three sides to form 6 cm x 4 cm film pouches, consisting in pouch surface area of 48 cm² (considering both sides). Next, 20 mL of EVOO were placed in, air bubbles were removed and the pouches were heat sealed on top, then forming four sided sealed pouches (Figure 1). Commercially available polypropylene films (PP films) were also used to form pouches for the olive oil packaging.

2.5.1 *EVOO quality maintenance under thermal and photo-oxidative environment of degradation*

The quality of edible oils and fats is mainly related to their oxidative stability, which can be determined during storage under normal ambient conditions and packaging. Though, in general, oxidation take a long time to occur which is impractical for routine analysis. For this reason, among the methods employed to give reasonable and accurate prediction of the product's shelf life, accelerated shelf life tests have often been used (KANAVOURAS, HERNANDEZ-MUNOZ, COUTELIERIS, 2006; MANCEBO-CAMPOS et al., 2008; ABDELAZIM, MAHMOUD, RAMADAN-HASSANIEN, 2013).

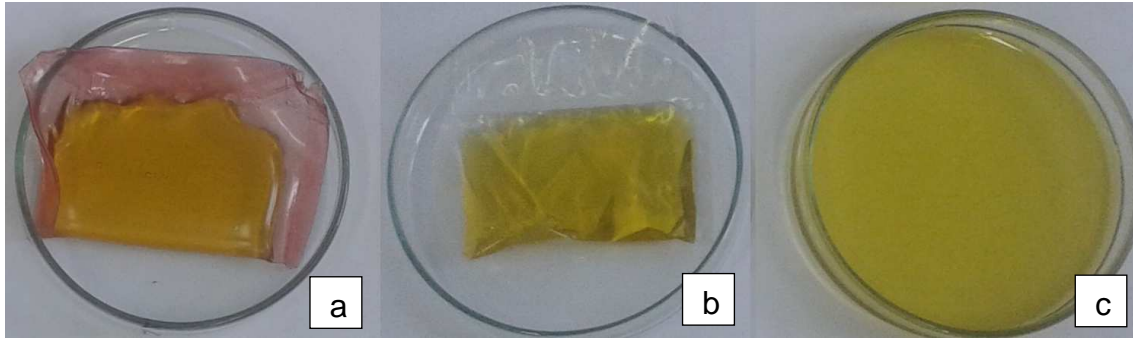


Figure 1. Extra-virgin olive oil packaged in the produced biodegradable film with anthocyanins - FA film (a), PP film (b) and Control oil without packaging (c).

The EVOO samples in the FA film pouches (FA oil) and in the PP film pouches (PP oil) were randomly positioned in a camera under an accelerated environment of degradation: 40 ± 2 °C, exposure to fluorescent lights with an intensity of 900-1000 lux and a relative humidity of 54 %. The quality of oil samples were determined by measuring PV, K_{232} , acidity, carotenoids, chlorophyll and color over 12 days of storage. An open glass Petri dish containing EVOO was used as control, maintaining the same proportion of oil volume/area as the produced pouches. The samples were evaluated every 4 days, in triplicate.

2.5.1.1 Peroxide values, K_{232} and acidity.

The peroxide value (PV) and acidity of samples were determined according to the IUPAC. PV was given in milliequivalents of active oxygen per kilogram of oil (mEq/kg) and acidity value was expressed as percent of oleic acid.

The K_{232} extinction coefficient, calculated from absorption of 1% solution in cyclohexane at 232 nm, with 1 cm of pass length, measured using a UV spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu, Japan), followed the analytical methods described in European Regulation EC 2568/91.

2.5.1.2 Carotenoids and Chlorophyll

Chlorophyll and carotenoid contents of olive oils were determined according to a procedure described by Mínguez-Mosquera et al. (1991). 1.5 g of each olive oil

sample was weighted and diluted in 5 mL cyclohexane. The absorbances, corresponding to the olive oil's dominant pigment fraction of chlorophyll (pheophytin "a") and carotenoid (lutein) were measured by a UV spectrophotometer (Shimadzu CPS-240A, Japan) at 670 nm and 472 nm, respectively. Appropriate molar absorption coefficients were used to obtain the levels of pigment, which were calculated as follows:

$$[\text{chlorophylls}] = (A_{670} \times 10^6) / (613 \times 100 \times \text{density}) \text{ mg/kg}$$

$$[\text{carotenoids}] = (A_{472} \times 10^6) / (2000 \times 100 \times \text{density}) \text{ mg/kg}$$

2.5.1.3 Color

Oil color was measured with a handle colorimeter (chromameter) (CR-300, Minolta Co. Ltd, Japan) using the CIELab color parameters. The parameters a* (red–green) and b* (yellow–blue) were determined. A white disk covered with a clear petri dish and a glass (a*: 0.01 and b*: 1.72) was used as a standard. Briefly, 2 mL of EVOO were placed in a clear petri dish, covered with a clear glass and positioned over the white disk.

2.6 Statistical Analysis

The results were evaluated by analysis of variance (ANOVA) and a Tukey test at significance level of 5% ($P < 0.05$) using the software Statistica 12.0. (STATSOFT Inc.), corresponding to the average of three replicates ($n = 3$) \pm standard deviation.

3. Results and discussion

3.1 Microcapsules Anthocyanin content

The anthocyanins content of the obtained microcapsules, expressed as malvidin equivalent, was 1.11 ± 0.04 mg of anthocyanins per gram of powder, which is similar to results found in other microencapsulation studies (OSORIO et al., 2010)

3.2 Films characterization

The film properties are presented in Table 1. Considering the anthocyanins quantification of the microcapsules, the proportion of microcapsules utilized on film solution and the film solution density on the plates, FA film was produced with 28.92 μg of anthocyanins (malvidin-3-glucoside equivalent) per cm^2 .

The film solution density ($0,04\text{g}/\text{cm}^2$) of the present study was chosen after preliminary tests in which was shown that thicker films could provide pouches with less chances of disruption during oil storage. Making a comparison with the film obtained in our previous study (STOLL et al., 2015 – *Art. 1, Table 4*), the present film presented higher thickness (0.388 mm, comparing to 0.154 mm).

Table 1. Biodegradable film with anthocyanins (FA) characterization

Thickness (mm)	0.338 ± 0.012
Moisture (%)	14.55 ± 0.46
WVP - ($\text{g} / \text{m s Pa}$)s 10^{11}	12.30 ± 0.58
Solubility	87.73 ± 1.47
% Elasticity	131.89 ± 7.90
Tensile Strenght (MPa)	0.63 ± 0.02
Transparency (%)	69.88 ± 1.47
Biodegradability (%)	96.27 ± 0.96

The analyses were performed in three replicated samples.
Values expressed as the mean \pm standard deviation

The film moisture and WVP were higher than our previous study film: 14.55% and 12.34 ($\text{g} / \text{m s Pa}$)s 10^{11} , comparing to 10.65% and 5.93 ($\text{g} / \text{m s Pa}$)s 10^{11}). In contrast to hydrophobic synthetic polymeric materials, the WVP of films prepared from biopolymers strongly depends on their thickness (BENBETTAÏEB et al., 2014). Indeed, the increase of the film permeability with the thickness indicates a water affinity of the film that could be explained by the presence of hygroscopic compounds (MORILLON et al., 2002). Since films contains hydrophilic compounds such as maltodextrin, glycerol and anthocyanins, the diffusion of water through the film was easier and consequently WVP increased, which is in accordance with the study of Benbettaïeb et al (2014).

Films elasticity was comparable with those reported in literature for biodegradable films, including the previous study, whereas tensile strength was relatively lower. However, mechanical properties may vary with specimen thickness, method of preparation, type of grips used, speed of testing and manner of measuring extension (Souza et al., 2012), what makes the comparison with literature data a difficult task.

Light transmission through FA and PP films are presented in Figure 2. The FA films were shown to have better barrier properties than PP film to UV and visible light (from 200 to 800 nm region). Low light transmission rates are an advantageous quality for food packaging, especially to oil, since the presence of light has been reported to have a more pronounced effect on deterioration of olive oil quality than elevated temperatures (KANAVOURAS, HERNANDEZ-MUNOZ, COUTELIERIS, 2006).

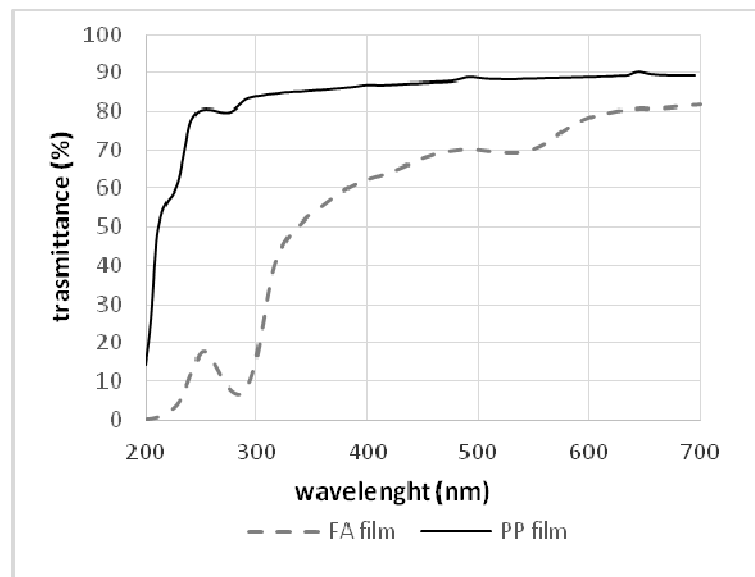


Figure 2. Light transmission through the produced biodegradable film with anthocyanins (FA film) and polypropylene (PP film) measured at selected wavelengths from 200 to 700 nm using a UV spectrophotometer.

3.3 *Film and microcapsules surface characteristics*

Microcapsules showed smooth surfaces and irregular, flake-like structures of different sizes at micrometer level, which is expected from freeze-dried and ground in mortar powders (GURAK, CABRAL, ROCHA-LEÃO, 2013). Analyzing FA film's surface, we can see that it is intact, without cracks or bubbles at the observed level. However small dispersed microstructures can be visualized, probably due to the presence of microcapsules. The size of these microstructures is smaller than the original microcapsules, and it can be due to the partial dissolution of them into the (Figure 3).

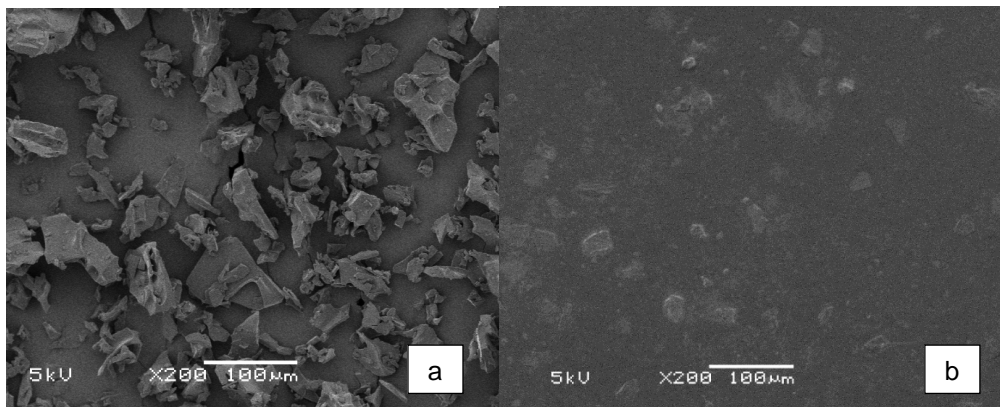


Figure 3. SEM surface morphology of anthocyanin microcapsules (a) and biodegradable film - FA (b) with a magnification of 200x.

3.4. *Films application on EVOO quality maintenance*

3.4.1. *Peroxide values, K_{232} and acidity.*

The extent of oxidation in oils has been frequently evaluated by measuring the peroxide value (PV), K_{232} and acidity. PV is related to the formation of hydroperoxides, the primary oxidation products, which are unstable and readily decompose to form mainly mixtures of volatile aldehyde compounds. The absorption coefficient K_{232} is used as quality factor because absorption at 232 nm is caused by hydroperoxides (primary stage of oxidation) and conjugated dienes (intermediate

stage of oxidation) (NIERAT et al., 2014). The oil acidity reflects the extent of hydrolytic activities (ABDELAZIM, MAHMOUD, RAMADAN-HASSANIEN, 2013).

As it can be seen on Table 2, the values of the initial PV, K_{232} and acidity of the extra-virgin olive oil studied are below the maximum levels established by the Codex Alimentarius Standards (CODEX STAN, 2001) for EVOOs, which are: $PV \leq 20$ mEq O_2 /kg; $K_{232} \leq 2.5$; free acidity $\leq 0.8\%$ in oleic acid.

Among the treatments, FA film showed the best results on protecting olive oil from the oxidative process. After 4 days of storage under accelerated environment of degradation, the PV of packaged olive oil in polypropylene pouches (PP oil) and the Control oil overpassed the maximum limit regulated by the Codex Alimentarius, while the oil packaged with the biodegradable active film kept under the limit up to the 8th day of storage.

Table 2. Oxidative stability of Extra-virgin olive oil – measured by Peroxide value (mEq O_2 /kg), K_{232} and acidity (% oleic acid) – packaged in different films: FA film (FA oil), PP film (PP oil) and without packaging (Control)

	Day 0	4 Days	8 Days	12 Days
Peroxide Values				
FA oil	10.74 ± 0.05 ^{Ac}	11.09 ± 0.12 ^{Bb}	13.58 ± 0.17 ^{Cb}	23.97 ± 0.58 ^{Ca}
PP oil	10.74 ± 0.0 ^{Ac}	169.34 ± 6.00 ^{Ab}	326.47 ± 9.83 ^{Aa}	161.47 ± 11.41 ^{Bb}
Control	10.74 ± 0.05 ^{Ad}	163.29 ± 3.98 ^{Ac}	222.10 ± 10.50 ^{Bb}	286.11 ± 15.35 ^{Aa}
K_{232}				
FA oil	2.21 ± 0.16 ^{Aa}	2.44 ± 0.09 ^{Ba}	2.23 ± 0.18 ^{Ba}	2.39 ± 0.04 ^{Ba}
PP oil	2.21 ± 0.16 ^{Ac}	4.22 ± 0.46 ^{Ab}	5.30 ± 0.50 ^{Ab}	8.60 ± 0.16 ^{Aa}
Control	2.21 ± 0.16 ^{Ab}	3.87 ± 0.03 ^{Ab}	4.05 ± 0.12 ^{Ab}	6.06 ± 0.43 ^{Aa}
Acidity (% oleic acid)				
FA oil	0.37 ± 0.00 ^c	0.41 ± 0.00 ^b	0.46 ± 0.00 ^a	0.46 ± 0.00 ^a
PP oil	0.37 ± 0.00 ^c	0.41 ± 0.01 ^b	0.46 ± 0.01 ^a	0.46 ± 0.00 ^a
Control	0.37 ± 0.00 ^c	0.41 ± 0.02 ^b	0.46 ± 0.00 ^a	0.46 ± 0.00 ^a

*The analyses were performed in three replicated samples. Values expressed as the mean ± standard deviation.

**Different letters (upper case) in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$) between the treatments, different letters (lower case) in the same line indicate significant differences ($p < 0.05$) between the time of storage.

It is noteworthy that the increase of legal quality indices PV and K_{232} , although being significant, were moderate for FA oil. Considering the storage conditions to which these oil were submitted – what can be observed by the high PV indexes of PP oil and Control oil – FA film offered a considerable protection to the packaged oil.

The increase of acidity, which occurs due to the free fatty acids hydrolysis, was moderate for all treatments. By this quality index, both packaging conditions (FA and PP) and the Control oil maintained their extra quality (<0.8%) at the end of the storage period.

The oxygen plays an important role on the entire and complex interactions in the olive oil. Besides that, antioxidant molecules are strongly influenced by oxygen presence, considering that many interactions during auto-oxidation period may be suppressed if oxygen availability is limited (PSOMIADOU, TSIMIDOU, 2002). The application of films on oil packaging provides an indicative of the oxygen barrier capability of the materials, so that if the quality of olive oil could be maintained, it would indirectly indicates a low oxygen permeability of the packaging (CARPINÉ et al., 2015).

Comparing the packaging materials used on the present study by their capability of avoiding peroxides formation, the biodegradable film developed offers a good protection against oxygen, besides being endowed with antioxidants. Meanwhile, polypropylene offers an almost insignificant oxygen protection to the packaged oil, once the PP oil oxidative condition after 12 days of storage was similar to the Control oil, which was directly exposed to the air. This is in accordance with the study of Pristouri et al. (2010), which concluded that oxygen rate transmission of PP was higher than polyethylene, and much higher than glass.

3.4.2 Carotenoids and Chlorophyll

Carotenoids and chlorophylls play an important role in fats and oils, apart from contributing to oil color. While chlorophylls decrease the autoxidation of oils in the dark, carotenoids demonstrate both antioxidant and prooxidant activity depending on the oil system. In the presence of light, chlorophyll acts as a photosensitizer for the formation of 1O_2 , however, carotenoids decrease the oxidation through 1O_2 quenching (CHOE, MIN, 2006).

Changes in the concentrations of chlorophylls and carotenoids in the EVOO packaged in FA and PP film pouches and open petri dish (Control) are shown in Figure 4.

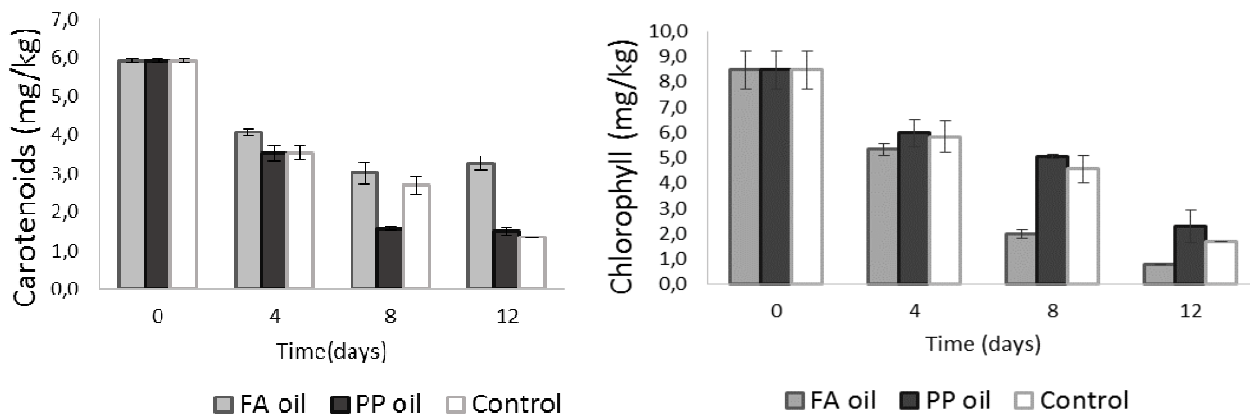


Figure 4. Evolution of carotenoids and chlorophylls content of extra-virgin olive oil during storage under different packaging films (FA film: FA oil; PP film: PP oil; without packaging: Control).

Besides the light causes a strong interference on pigments retention, the difference on light barrier protection between PP and FA film were not perceived on this parameter, and pigment decreased in all storage conditions in a similar trend. During the period analyzed, concentration of carotenoids decreased from 5.43 mg/kg to 1.33 mg/kg (up to 77.5% of loss) whereas that chlorophylls decreased from 8.47 mg/kg to 0.79 mg/kg (90.6% of loss). Chlorophylls losses were more noticeable than those related to carotenoid, especially in light conditions, which reaffirm the findings of Dabbou et al. (2011), Guil-Guerrero & Urda-Romacho (2009), Rizzo et al. (2014) and Del Caro et al. (2006).

3.4.3 Color

Color, one of the major attributes that affect the consumer's perception of the quality of virgin olive oil, is directly related to pigment content and is generally expressed by the International Commission on Illumination a^* and b^* values. (MÍNGUEZ-MOSQUERA et al., 1991).

The color of oils depends on the wavelengths of transmitted visible light, and is chiefly influenced by two groups of minor oil constituents, carotenoids and

chlorophylls (SIKORSKA et al., 2007). Color variations means deterioration in the organoleptic value of EVOO and thus represents a loss in the commercial importance of the product, because it is one of the sensorial parameters that make it attractive to the consumers (MÉNDEZ, FALQUÉ, 2007).

The value of a^* increased slightly, whereas that of b^* decreased in a more pronounced way, which corresponds to a shift from green to red, and from yellow to blue, respectively (SIKORSKA et al., 2007). The color parameters evolution of the packaged oils is shown in Figure 5.

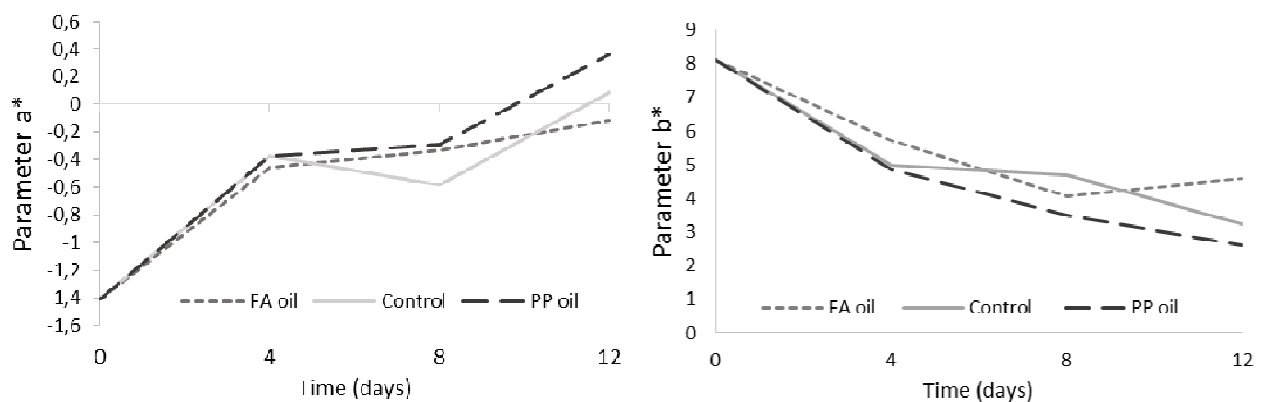


Figure 5 – Evolution of the color parameters (a^* and b^*) of extra-virgin olive oil during storage under different packaging films (FA film: FA oil; PP film: PP oil; without packaging: Control).

The decrease in parameter b^* , which reveals a loss of yellowness, can be related to the carotenoids degradation over the time, while the increase of parameter a^* represents a loss of green color and is related to chlorophyll degradation. Oxidation products absorbing in the visible spectral range may also contribute to color changes (SIKORSKA et al., 2007). Color parameters changes followed a similar trend in all storage conditions.

4. Conclusion

The results of the present study confirm the potential of applying active biodegradable films with encapsulated anthocyanins to the packaging of EVOO. The developed film presented a homogeneous surface, satisfactory mechanical

properties and offered better protection against oil oxidative deterioration when compared to a commercial polypropylene, besides being highly biodegradable.

The EVOO packaged in the developed film presented good oxidation stability under accelerated thermal and photo-oxidative environment of degradation, since it remained under the limits (PV, acidity and K_{232}) established by the Codex until the 8th day of storage, whereas EVOO packaged in polypropylene was degraded on 4th day.

Since no differences on the protection of EVOO's pigments and color was observed between the developed film and PP and considering light is one of the main responsible for oil degradation, improvements on UV-Visible light barrier of films could be developed, even though the developed film was better than PP concerning this property.

Based on these results, this study may be useful for the technological enhancement of films endowed with anthocyanins encapsulated with maltodextrin for oil packaging applications.

Acknowledgments

The authors are grateful to Brazilian agencies, CNPq and FAPERGS, and also to Eletronic Microscope Center (CME) of Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) for technical assistance.

Reference list

ABDELAZIM, A. A.; MAHMOUD, A.; RAMADAN-HASSANIEN, M. F. Oxidative stability of vegetable oils as affected by sesame extracts during accelerated oxidative storage. **Journal of food science and technology**, v. 50, n. 5, p. 868-878, 2013.

ANGEROSA, F. et al. Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1–2, p. 17-31, 2004.

ASTM. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard terminology relating to plastics – D 883, Annual book of ASTM, Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials, 1999.

BENBETTAÏEB, N. et al. Barrier, structural and mechanical properties of bovine gelatin–chitosan blend films related to biopolymer interactions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 12, p. 2409-2419, 2014.

CARPINÉ, D. et al. Development and Characterization of Soy Protein Isolate Emulsion-Based Edible Films with Added Coconut Oil for Olive Oil Packaging: Barrier, Mechanical, and Thermal Properties. **Food and Bioprocess Technology**, v.8, p. 1811–1823, 2015.

CODEX STAN 33-1981 (Rev. 1-1989) (2001). **Codex Alimentarius**. Fats, oils and related products. Rome: Food and Agricultural Organization of the United Nations.

CHOE, E.; MIN, D. B. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 5, n. 4, p. 169-186, 2006.

COSTA, T. M. H.; DE OLIVEIRA RIOS, A.; FLÔRES, S. H. Residues of minimally processed carrot and gelatin capsules: Potential materials for packaging films. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 1071-1078, 2015.

DABBOU, S. et al. Impact of packaging material and storage time on olive oil quality. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 74, p. 16929-16936, 2013.

DAVIS, G.; SONG, J. H. Biodegradable packaging based on raw materials from crops and their impact on waste management. **Industrial crops and products**, v. 23, n. 2, p. 147-161, 2006.

DEL CARO, A. et al. Influence of technology, storage and exposure on components of extra virgin olive oil (Bosana cv) from whole and de-stoned fruits. **Food chemistry**, v. 98, n. 2, p. 311-316, 2006.

GONTARD, N. et al. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 29, n. 1, p. 39-50, 1994.

GUIL-GUERRERO, J. L. Quality of extra virgin olive oil affected by several packaging variables. **Grasas y Aceites**, v. 60, n. 2, p. 125-133, 2009.

GURAK, P. D.; CABRAL, L. M. C.; ROCHA-LEÃO, M. H. Production of grape juice powder obtained by freeze-drying after concentration by reverse osmosis. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 6, p. 1011-1017, 2013.

GOMEZ-ESTACA, J. et al. Advances in antioxidant active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 35, n. 1, p. 42-51, 1// 2014.

HUANG, C. L.; SUMPIO, B. E. Olive oil, the mediterranean diet, and cardiovascular health. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 207, n. 3, p. 407-416, 2008.

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). **Standard Method for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives**; Paquot, C., Hautfenne, A. Blackwell Scientific Publications: London, U.K., 1987

KANAVOURAS, A.; HERNANDEZ-MUNOZ, P.; COUTELIERIS, F. A. Packaging of olive oil: Quality issues and shelf life predictions. **Food Reviews International**, v. 22, n. 4, p. 381-404, 2006.

KANAVOURAS, A. et al. Oxidation-derived flavor compounds as quality indicators for packaged olive oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 81, n. 3, p. 251-257, 2004.

MANCEBO-CAMPOS, V.; FREGAPANE, G.; DESAMPARADOS SALVADOR, M. Kinetic study for the development of an accelerated oxidative stability test to estimate virgin olive oil potential shelf life. **European journal of lipid science and technology**, v. 110, n. 10, p. 969-976, 2008.

MARTUCCI, J. F.; RUSECKAITE, R. A. Biodegradation of three-layer laminate films based on gelatin under indoor soil conditions. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, n. 8, p. 1307-1313, 2009.

MINGUEZ-MOSQUERA, M. I. et al. Color-pigment correlation in virgin olive oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 68, n. 5, p. 332-336, 1991.

MORILLON, V. et al. Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 42, n. 1, p. 67-89, 2002.

MÉNDEZ, A. I.; FALQUÉ, E. Effect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 521-529, 2007.

NIERAT, T. H. et al. Storage Age Dependence of Olive Oil Acidity in Different Locations in Palestine. **Journal of Physical Science**, v. 25, n. 1, p. 33-43, 2014.

OFFICIAL, A. tentative methods of the American Oil Chemists' Society. **Champaign, IL**, 1993.

OSORIO, Coralía et al. Microencapsulation by spray-drying of anthocyanin pigments from corozo (*Bactris guineensis*) fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 11, p. 6977-6985, 2010.

PISCOPO, A.; POIANA, M. **Packaging and storage of olive oil**. INTECH Open Access Publisher, 2012.

PORTER, W. L. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. In **Antioxidants: Chemical, Physiological, Nutritional and Toxicological Aspects**; Williams, G. M. (Ed.); Princeton Scientific: Princeton, NJ, pp 93-122, 1993.

PRISTOURI, G.; BADEKA, A.; KONTOMINAS, M. G. Effect of packaging material headspace, oxygen and light transmission, temperature and storage time on quality characteristics of extra virgin olive oil. **Food control**, v. 21, n. 4, p. 412-418, 2010.

PSOMIADOU, E.; TSIMIDOU, M. Stability of virgin olive oil. 2. Photo-oxidation studies. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 4, p. 722-727, 2002.

REGULATION, C. No. 2568/91 of July 1991. On the characteristics of olive and olive pomace oils and on their analytical methods. **Off. J. Eur. Commun L**, v. 248, p. 29-32, 1991.

RIZZO, V. et al. Quality Changes of Extra Virgin Olive Oil Packaged in Coloured Polyethylene Terephthalate Bottles Stored Under Different Lighting Conditions. **Packaging Technology and Science**, v. 27, n. 6, p. 437-448, 2014.

SCHAICH, K. M. et al. Lipid oxidation. **Biochemistry of foods**, v. 3, p. 419-78, 2013.

SERVILI, M. et al. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1–2, p. 113-127, 10/29/ 2004.

SHAHIDI, F; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity in food and biological systems. In: **ACS symposium series**. Oxford University Press, p. 36-66, 2007.

SIKORSKA, E. et al. Changes in colour of extra-virgin olive oil during storage. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 57, n. 4C, p. 495-498, 2007.

SRIVASTAVA, J.; VANKAR, P. S. Canna indica flower: New source of anthocyanins. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 1015-1019, 2010.

SOUZA, A. C., et al. Cassava starch biodegradable films: Influence of glycerol and clay nanoparticles content on tensile and barrier properties and glass transition temperature. **LWT – Food Science and Technology**, 46(1), 110-117, 2012.

STOLL, L. et al. Microencapsulation of anthocyanins with different wall materials and its application in active biodegradable films. **Food and Bioprocess Technology**, v.8, n. 10, p.1-10, 2015.

TALJA, R. A. et al. Effect of type and content of binary polyol mixtures on physical and mechanical properties of starch-based edible films. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 2, p. 269-276, 2008.

TANG, C.-H. et al. Effect of transglutaminase treatment on the properties of cast films of soy protein isolates. **Journal of Biotechnology**, v. 120, n. 3, p. 296-307, 2005.

VAN ACKER, S. A. B. E. et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.

YOUSUF, B. et al. Health Benefits of Anthocyanins and Their Encapsulation for Potential Use in Food Systems: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 00-00, 2015.

CAPÍTULO 5 - DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

5 DISCUSSÃO GERAL

A primeira etapa do trabalho consistiu em realizar a extração e microencapsulação de antocianinas a partir de um subproduto largamente produzido na indústria vitivinícola. O bagaço de uva (cascas e restos de polpa) proveniente do processo de vinificação foi utilizado como fonte de antocianinas, com o objetivo de fornecer propriedades antioxidantes aos filmes biodegradáveis desenvolvidos. Devido à alta instabilidade das antocianinas aos efeitos da luz, calor e oxigênio, optou-se por realizar a microencapsulação das mesmas.

A Artigo 1, intitulado “Microencapsulation of anthocyanins with different wall materials and its application in active biodegradable films” (Capítulo 3) engloba as etapas de microencapsulação de antocianinas e o efeito de sua aplicação em filmes biodegradáveis. Maltodextrina, goma arábica e a combinação destes materiais foram efetivos na microencapsulação das antocianinas extraídas do bagaço, com retenção de até 91,5% e eficiência de microencapsulação de até 89,6%, sem diferença estatística entre os três tipos de microcápsulas produzidas.

Os resultados do estudo sugerem que a solubilidade das microcápsulas no meio interfere na liberação dos compostos encapsulados, e conseqüentemente, na atividade antioxidante que estes exercem sobre o meio. Apesar das microcápsulas feitas a partir de goma arábica apresentarem maior atividade antioxidante em água, filmes elaborados com microcápsulas de maltodextrina (F.MD1) tiveram maior efeito protetor ao óleo de girassol. Os F.MD's apresentaram superfície mais uniforme, homogênea, e livre de fissuras que os demais filmes, o que justifica suas melhores propriedades mecânicas e, possivelmente, sua maior proteção ao oxigênio, o qual é essencial para ocorrer a degradação oxidativa.

A partir da melhor formulação elaborada no Artigo 1, o filme com microcápsulas produzidas com maltodextrina foi utilizado na produção de sachês de

azeite de oliva extra-virgem (Artigo 2). Contudo, verificou-se a necessidade de aumentar a espessura do filme para formação dos sachês. Para tanto, aumentou-se a quantidade de solução filmogênica por área distribuídas em cada placa. Esta alteração afetou algumas de suas características, as quais estão relacionadas na Tabela 3, juntamente com as formulações dos filmes produzidos.

Assim, no Artigo 2, intitulado “Application of active biodegradable film with encapsulated anthocyanins on oil pouches – effect on extra-virgin olive oil quality during storage” (Capítulo 3), o filme biodegradável desenvolvido (FA) apresentou melhor proteção ao azeite de oliva embalado quando comparado à proteção oferecida por um filme sintético comercial (polipropileno), com preservação do azeite das reações de oxidação (peróxidos e K_{232}) pelo dobro do tempo - 8 dias (sob limites estabelecidos pelo Codex), comparado a 4 dias para o azeite embalado em polipropileno.

Tabela 3 - Formulações e características dos filmes biodegradáveis produzidos a partir de microcápsulas de maltodextrina (MD)

	F. MD 1 (Artigo 1)	FA (Artigo 2)
Formulação		
Amido (%)	5	5
Glicerol (%)	2	2
Microcápsulas (%)	8	8
Sólidos/área (g/cm ²)	0,02	0,04
Caracterização		
Espessura (mm)	0,140 ± 0,006	0,338 ± 0,012
Umidade (%)	10,65 ± 0,38	14,55 ± 0,46
Permeabilidade ao Vapor d'Água (g /m s Pa)s 10 ¹¹	5,93±0,47	12,30 ± 0,58
Solubilidade	85,8 ± 1,46	87,73 ± 1,47
% Elasticidade	124,2 ± 10,8	131,9 ± 7,9
Resistência à tração (MPa)	0,75 ± 0,11	0,63 ± 0,02

Ao avaliar as diferenças entre os filmes produzidos no 1º e 2º artigo, a espessura, umidade e permeabilidade ao vapor de água foram as características mais proeminentes. Como já relatado na literatura, o aumento da espessura em

filmes com componentes hidrofílicos promove aumento na sua permeabilidade ao vapor, visto que facilita o processo de difusão da água através do mesmo. A formulação do filme, composta por materiais extremamente hidrofílicos como maltodextrina, glicerol e antocianinas, justifica também o aumento da umidade em filmes mais espessos, onde os componentes do filme dificultam a saída da água durante o processo de secagem.

6 CONCLUSÕES

Resultados satisfatórios na microencapsulação de antocianinas foram obtidos quando maltodextrina, goma arábica e a mistura destes foram utilizadas como agentes encapsulantes. Apesar da goma arábica ter apresentado boa eficiência na microencapsulação de antocianinas, seu uso em filmes biodegradáveis, nas proporções avaliadas no presente estudo, resultou em filmes com propriedades mecânicas insatisfatórias e com baixa proteção à oxidação de óleo de girassol, quando comparado a filmes produzidos com maltodextrina.

Os resultados obtidos neste trabalho comprovam a potencialidade da utilização de maltodextrina como um ingrediente na produção de filmes biodegradáveis com antocianinas encapsuladas, tanto por suas propriedades como agente encapsulante, quanto por suas propriedades formadoras de filme. Os filmes desenvolvidos com este ingrediente apresentaram propriedades mecânicas satisfatórias, alta biodegradabilidade, e ofereceram proteção às reações oxidativas em óleo de girassol e azeite de oliva. Futuramente, novos estudos podem ser realizados a partir de filmes com diferentes concentrações de antocianinas encapsuladas, a fim de compreender e melhorar a atuação antioxidante das microcápsulas na proteção de produtos alimentícios.

REFERÊNCIAS

- ABE, L. T. et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Food Science and Technology**, v. 27, p. 394-400, 2007.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis**. (18th ed.). Maryland: AOAC, 2006
- ABARGHUEI, M. J.; ROUZBEHAN, Y.; ALIPOUR, D. The influence of the grape pomace on the ruminal parameters of sheep. **Livestock Science**, v. 132, n. 1–3, p. 73-79, 2010.
- AHMED, M. et al. Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 9, p. 1307-1312, 2010.
- ANDERSON, R. A. Water absorption and solubility and amylograph characteristics of roll-cooked small grain products. **Cereal Chemistry (USA)**, n. 59, p. 265–269. 1982
- ARORA, A.; PADUA, G. W. Review: nanocomposites in food packaging. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 1, p.43-49, 2010
- ASSIS, L. M. D. et al. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, p. 99-109, 2012.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). Standard terminology relating to plastics – D 883, **Annual book of ASTM**, Philadelphia, PA, 1999.
- BAUMGÄRTEL, T. et al. A note on digestibility and energy value for sheep of different grape pomace. **Small Ruminant Research**, v. 67, p. 302-306, 2007.
- BERNHOF, A. A brief review on bioactive compounds in plants. Em: **Proceedings from a symposium held at The Norwegian Academy of Science and Letters**, Oslo, Norway, 2010.
- BODAGHI, H. et al. Evaluation of the photocatalytic antimicrobial effects of a TiO₂ nanocomposite food packaging film by in vitro and in vivo tests. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n.2, p. 702-706, 2013
- BONILLA, J. et al. Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: possibilities and limitations. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 2, p. 208-213, 2012.

BUCIĆ-KOJIĆ, A. et al. Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 236-242, 2007.

BUKZEM, A. L., SANTOS, D. M., ASCHER, D. P. R. Filmes Biodegradáveis a Base de Fécula de Mandioca e Bagaço de Cevada Obtidos por Extrusão Termoplástica. *Revista Agrotecnologia*, v. 3, n. 2, p. 89 - 107, 2012.

CAMPOS, L. M. A. S. et al. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8413-8420, 2008.

CARPINÉ, D. et al. Development and Characterization of Soy Protein Isolate Emulsion-Based Edible Films with Added Coconut Oil for Olive Oil Packaging: Barrier, Mechanical, and Thermal Properties. **Food and Bioprocess Technology**, v.8, p. 1811–1823, 2015.

CASTAÑEDA-OVANDO, A. et al. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, p. 859-871, 2009.

CHIOU, A. et al. Anthocyanins content and antioxidant capacity of Corinthian currants (*Vitis vinifera* L., var. Apyrena). **Food Chemistry**, v. 146, p. 157-165, 2014.

CHO, S. Y., LEE, S. Y., & RHEE, C. Edible oxygen barrier bilayer film pouches from corn zein and soy protein isolate for olive oil packaging. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 8, p. 1234-1239, 2010.

COLÍN-CHÁVEZ, C. et al. Fabrication and Properties of Antioxidant Polyethylene-based Films Containing Marigold (*Tagetes erecta*) Extract and Application on Soybean Oil Stability. **Packaging Technology and Science**, v. 26, n. 5, p. 267-280, 2013

DAINELLI, D. et al. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, Supplement 1, p. 103-112, 2008.

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

DE JONG A. R., BOUMANS H., SLAGHEK T., VAN VEEN J., RIJK R., & VAN ZANDVOORT M. Active and intelligent packaging for food: Is it the future? **Food Additives and Contaminants**, v.22, n.10, p.975–979, 2005.

DENG, Q.; PENNER, M. H.; ZHAO, Y. Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of wine grape pomace skins and development of wine grape (cv. Merlot) pomace extract based films. **Food Research International**. p. 2712-2720, 2011.

DO SUL, J. A. I.; COSTA, M. F. The present and future of microplastic pollution in the marine environment. **Environmental Pollution**, v. 185, p. 352-364, 2014.

DUKALSKA, L. et al. Studies of biodegradable polymer material suitability for Food packaging application. **3rd Baltic Conference on Food Science and Technology**. p. 64-68. Faculty of Food Technology, Foodbalt, 2008.

FALGUERA, V. et al. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 6, p. 292-303, 2011.

FAO. FAOSTAT: Countries by Commodity: Top production – grapes - 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em abril de 2014.

FERNÁNDEZ-MAR, M. I. et al. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. **Food Chemistry**, v. 130, p. 797-813, 2012.

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

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

GARRIDO, T. et al. Valorization of soya by-products for sustainable packaging. **Journal of Cleaner Production**, v. 64, n. 0, p. 228-233, 2014.

GENNADIOS, A.; HANNA, M. A.; KURTH, L. B. Application of Edible Coatings on Meats, Poultry and Seafoods: A Review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 30, n. 4, p. 337-350, 1997.

GHARSALLAOUI, A. et al. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107-1121, 2007.

GOMEZ-ESTACA, J. et al. Advances in antioxidant active food packaging: **Trends in Food Science & Technology**, v. 35, p. 42-51, 2014.

GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-packaging: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. **Boletim da SBCTA**, Campinas, v. 30, n. 1, p.3-15, 1996.

GRUZ, A. P. G. et al. Recuperação de compostos bioativos a partir do bagaço de uva. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 4, p.1147-1157, 2013.

HE, F. et al. Biosynthesis of Anthocyanins and Their Regulation in Colored Grapes. **Molecules**, v. 15, p. 9057-9091, 2010.

HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P.; SARMENTO, S. B. S. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 231-240, 2008.

HONG, S.I.; KROCHTA, J. M. Oxygen barrier performance of whey-protein-coated plastic films as affected by temperature, relative humidity, base film and protein type. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 3, p. 739-745, 2006.

HORST, M. A.; LAJOLO, F. M., Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos. Em: **COZZOLINO, S. S. S. (Org)**. Biodisponibilidade de nutrientes. 2 ed. São Paulo: Manole, v. 1, p. 697-731, 2007.

IACOPINI, P. et al. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 589-598, 2008.

IBRAVIN. Uvas processadas pelas empresas do Rio Grande do Sul. Disponível em <<http://www.ibravin.org.br/dados-estatisticos>>. Acesso em maio de 2014.

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

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). **Standard Method for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives**; Paquot, C., Hautfenne, A. Blackwell Scientific Publications: London, U.K., 1987

JIANG, Y.; SIMONSEN, J.; ZHAO, Y. Compression-molded biocomposite boards from red and white wine grape pomaces. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 119, n. 5, p. 2834-2846, 2011.

JOHANSSON, C. et al. Renewable fibers and bio-based materials for packaging applications - a review of recent developments. **BioResources**, v. 7, n. 2, p. 2506-2552, 2012.

JÚNIOR, A., et al. Biodegradable Duo-functional Active Film: Antioxidant and Antimicrobial Actions for the Conservation of Beef. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n.1, p. 75-87, 2015.

KALLITHRAKA, S. et al. Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.): association with antiradical activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, p. 375-386, 2005.

KANG, H. J.; MIN, S. C. Potato peel-based biopolymer film development using high-

pressure homogenization, irradiation, and ultrasound. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 6, p. 903-909, 2010.

KAYSERILIOĞLU, B. Ş. et al. Use of xylan, an agricultural by-product, in wheat gluten based biodegradable films: mechanical, solubility and water vapor transfer rate properties. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 3, p. 239-246, 2003.

KUSKOSKI, E. M. et al. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. **Food Science and Technology**, v. 24, p. 691-693, 2004.

LAFKA, T. I., SINANOĞLU, V., LAZOS, E. F. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1206-1214, 2007.

LAUFENBERG, G. Transformation of vegetable waste into added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, p.167-198, 2003.

LORRAIN et al. Evolution of Analysis of Polyphenols from Grapes, Wines and Extracts. **Molecules**, v. 18, p.1076-1100, 2013.

MADENE, A., Flavour encapsulation and controlled release – a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 41, n.1, p. 1-21, 2006

MAIER, T et al. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 112, p. 551-559. 2009.

MARTINS J.T., CERQUEIRA M. A., VICENTE A. A. Influence of a-tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. **Food Hydrocolloids**, v.27, p.220-227, 2012.

MARTUCCI, J. F.; RUSECKAITE, R. A. Biodegradation of three-layer laminate films based on gelatin under indoor soil conditions. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, n. 8, p. 1307-1313, 2009.

MALI, S. et al. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, p. 129-135, 2004.

MALI, S. et al. Mechanical and thermal properties of yam starch films. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 1, p. 157-164, 2005.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 137-156, 2010.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Society for Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MANGARAJ, S.; GOSWAMI, T. K.; MAHAJAN, P. V. Applications of Plastic Films for Modified Atmosphere Packaging of Fruits and Vegetables: A Review. **Food Engineering Reviews**, v. 1, n. 2, p. 133-158, 2009.

MANÉ, C. et al. Optimization of Simultaneous Flavanol, Phenolic Acid, and Anthocyanin Extraction from Grapes Using an Experimental Design: Application to the Characterization of Champagne Grape Varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7224-7233, 2007.

MELO, P. S et al. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, v. 181, n. 0, p. 160-169, 2015

MENEGUZZO, J., MANFROI, L., RIZZON, L. A. **Sistemas de Produção de Vinho Tinto/ Embrapa Uva e Vinho** (2006). Disponível em < <http://www.cnpv.embrapa.br/publica/sprod/VinhoTinto> > Acesso em abril de 2014

MINGUEZ-MOSQUERA, M. I. et al. Color-pigment correlation in virgin olive oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 68, n. 5, p. 332-336, 1991.

MIRABELLA, N.; CASTELLANI, V.; SALA, S. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 65, n. 0, p. 28-41, 2014.

MISTRITIS, Antonis et al. Analysis of the effect of perforation on the permeability of biodegradable non-barrier films. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 32-38, 2011.

MITIĆ, M., et al. Phytochemical profiles and antioxidant activities of Serbian table and wine grapes. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, p. 1619-1626, 2012.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1–2, p. 95-111, 2004.

NEDOVIC, V. et al. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, v. 1, n. 0, p. 1806-1815, 2011.

NEGRO, C., TOMMASI, L., MICELI, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. **Bioresource Technology**, v. 87 p. 41–44, 2003.

NERANTZIS, E. T.; TATARIDIS, P. Integrated enology - utilization of winery wastes for the production of high added value products. **Journal of Science & Technology**, v. 1 n. 3 p. 79-89, 2006.

OLIVAS, G. I, RODRIGUEZ, J. J, BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Edible coatings composed of methylcellulose stearic acid, and additives to preserve quality of pear wedges. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 27 ,p. 299 – 320, 2003.

PETERSSON, M.; STADING, M. Water vapour permeability and mechanical properties of mixed starch-monoglyceride films and effect of film forming conditions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.19, n.2, p.123-132, 2005.

PINELO, M.; ARNOUS, A.; MEYER, A. S. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 11, p. 579-590, 2006.

PIRRA, A. J. Caracterização e tratamento de efluentes vinícolas da Região Demarca do Douro. **Tese de Doutorado**. Vila Real, Três-os-Montes: Universidade de Trás-dos Montes e Alto Douro, 2005.

POSHADRI, A., KUNA, A. Microencapsulation technology: a review. **Journal of Research Angra**, v. 38, p. 86-102, 2010.

PHOOPURITHAM et al. Antioxidant Properties of Selected Plant Extracts and Application in Packaging as Antioxidant Cellulose-Based Films for Vegetable Oil. **Packaging Technology and Science**, v. 25, n. 3, p. 125-136, 2012.

PRASAIN, J. K. et al. Liquid chromatography tandem mass spectrometry identification of proanthocyanidins in rat plasma after oral administration of grape seed extract. **Phytomedicine**, v. 16, p. 233-243, 2009.

PRISTOURI, G.; BADEKA, A.; KONTOMINAS, M. G. Effect of packaging material headspace, oxygen and light transmission, temperature and storage time on quality characteristics of extra virgin olive oil. **Food control**, v. 21, n. 4, p. 412-418, 2010.

PROTAS, J.S.F, CAMARGO, U. A. **Vitivinicultura brasileira : panorama setorial de 2010**. Brasília, DF: SEBRAE - Bento Gonçalves, IBRAVIN, Embrapa Uva e Vinho. 2011. 110 p.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

REIS, Letícia Caribé Batista et al. Active biocomposites of cassava starch: the effect of yerba mate extract and mango pulp as antioxidant additives on the properties and the stability of a packaged product. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 382-391, 2015.

REGULATION, C. No. 2568/91 of July 1991. On the characteristics of olive and olive pomace oils and on their analytical methods. **Off. J. Eur. Commun L**, v. 248, p. 29-32, 1991.

RHIM, J.W.; WANG, L.F.; HONG, S.I. Preparation and Characterization of Agar/Silver Nanoparticles Composite Films With Antimicrobial Activity. **Food Hydrocolloids**, v.33, p.327-335, 2013.

RIZZO, V. et al. Quality Changes of Extra Virgin Olive Oil Packaged in Coloured Polyethylene Terephthalate Bottles Stored Under Different Lighting Conditions. **Packaging Technology and Science**, v. 27, n. 6, p. 437-448, 2014.

ROBERTSON, G. L. **Food Packaging: Principles and Practice, Third Edition**. Taylor & Francis, 2012. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=y27tL_7ZJFUC>. Acesso em abril de 2014.

ROCKENBACH, I. I. et al. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 238-244, 2008.

RUBERTO, G. et al. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. **Food Chemistry**, v. 100, p. 203-210, 2007.

SHAHIDI, F., & HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.

SANTANA, M.C.C.B. *et al.* Incorporação de Urucum como Aditivo Antioxidante em Embalagens Biodegradáveis a Base de Quitosana. **Ciência Rural**, v.43, n.3, mar, 2013.

SANT'ANNA, V. et al. The effect of the incorporation of grape marc powder in fettuccini pasta properties. **LWT-Food Science and Technology**, v. 58, n. 2, p. 497-501, 2014.

SHI, W.; DUMONT, M. J. Processing and physical properties of canola protein isolate-based films. **Industrial Crops and Products**, v. 52, n. 0, p. 269-277, 2014.

SILVA, G. J. F. et al. Formulação e estabilidade de corantes de antocianinas extraídas das cascas de jaboticaba (*myrciaria ssp.*). **Alimentos e nutrição**, v. 21, n. 3, p. 429-436, 2010.

SILVA, P. I. et al. Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 538-544, 2013.

SILVA, V. M., VIEIRA, G. S., & HUBINGER, M. D. Influence of different combinations of wall materials and homogenisation pressure on the microencapsulation of green coffee oil by spray drying. **Food Research International**, v. 61, n. 0, p. 132-143, 2014.

SIRACUSA, V. et al. Biodegradable polymers for food packaging: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, n. 12, p. 634-643, 2008.

SOBRAL, P. J. A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 6, 2000.

SOUZA, C. O. et al. Mango and acerola pulps as antioxidant additives in cassava starch bio-based film. **Journal agriculture food chemistry**, v.1, n.1, 2011.

SOUZA, V. B. et al. Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the bordo grape (*vitis labrusca*). **Food and bioproducts processing**. v. 93, 39–50, 2015

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

TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. **Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids**. Plant Journal, v. 54, p. 733-749, 2008.

TALJA, R. A. et al. Effect of type and content of binary polyol mixtures on physical and mechanical properties of starch-based edible films. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 2, p. 269-276, 2008.

TANG, C. H. et al. Effect of transglutaminase treatment on the properties of cast films of soy protein isolates. **Journal of Biotechnology**, v. 120, n. 3, p. 296-307, 2005.

TERCI, D. B. L.; ROSSI, A. V. Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução?, **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 684, 2002.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science & Technology**, v. 14, n. 3, p. 71-78, 2003.

TSUDA, T., et al. Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. **Biochemical Pharmacology**, v. 52, n. 7, p. 1033-1039, 1996.

VALDUGA, E. et al. Extração, secagem por atomização e microencapsulamento de antocianinas do bagaço da uva "Isabel" (*Vitis labrusca*). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 1568-1574, 2008.

VAN ACKER, S. A. B. E., et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.

VANIN, F. M. et al. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 5, p. 899-907, 2005.

VEIGA-SANTOS, P. et al. Mechanical properties, hydrophilicity and water activity of

starch-gum films: effect of additives and deacetylated xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 2, p. 341-349, 2005.

WANG, H., CAO, G., PRIOR, R. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **J. Agric. Food Chem.** v. 45, p. 304-309, 1997.

WANG, L., et al. Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 1, p. 35-41, 2013

WANG, Q. et al. Antioxidant activity and physicochemical properties of chitosan films incorporated with Lycium barbarum fruit extract for active food packaging. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 2, p. 458-464, 2015.

WIJNGAARD, H. et al. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. **Food Research International**, v. 46, p. 505-513. 2012.

XIA, E. et al. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. **International Journal of Molecular Science**, v. 11, p. 622-646, 2010.

YAMASHITA, F., NAKAGAWA, A., VEIGA, G. F., MALI, S., GROSSMANN, M. V. E. Filmes biodegradáveis para aplicação em frutas e hortaliças minimamente processadas. **Brazilian Journal of Food Technol**, v. 8, n. 3, p. 335-343, 2005.

YANG, J., MARTINSON, T. E., LIU, R. H. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. **Food Chemistry**, v. 116, p. 332-339, 2009.

YILDIRIM, H. K. et al. Antioxidant activities of organic grape, pomace, juice, must, wine and their correlation with phenolic content. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 40, p. 133-142, 2005.

YILMAZ, Y., TOLEDO, R. T. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n.1, p. 41-48, 2006

YOSHIDA, C. M. P.; ANTUNES, A. J. Aplicação de filmes protéicos à base de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, n.2, p. 420-430, 2009.

YU, J., AHMEDNA, M. Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 221-237, 2013.

YOUSUF, B. et al. Health Benefits of Anthocyanins and Their Encapsulation for Potential Use in Food Systems: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, just-accepted, p. 00-00, 2015.

ZUIDAM, N. J., & SHIMONI, E. Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In **Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing** (p. 3-29). Springer: New York, 2010.