



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

Tese de doutorado

**Microencapsulamento de compostos bioativos da uva (*Vitis labrusca* L.) e
efeito do tratamento pós-colheita com UV-C em uvas Bordô**

Luiza Siede Kuck

Porto Alegre, 2016.

LUIZA SIEDE KUCK

Microencapsulamento de compostos bioativos da uva (*Vitis labrusca* L.) e efeito do tratamento pós-colheita com UV-C em uvas Bordô.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como um dos requisitos para a obtenção do grau de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Caciano Pelayo Zapata Noreña

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Kuck, Luiza Siede
Microencapsulamento de compostos bioativos da uva
(Vitis labrusca L.) e efeito do tratamento pós-
colheita com UV-C em uvas Bordô / Luiza Siede Kuck. --
2016.
213 f.

Orientador: Caciano Pelayo Zapata Noreña.

Tese (Doutorado) -- 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, 2016.

1. uva. 2. polifenóis. 3. microencapsulamento. 4.
estabilidade. 5. irradiação UV-C. I. Noreña, Caciano
Pelayo Zapata, orient. II. Título.

Luiza Siede Kuck
(Bacharel em Química de Alimentos, MSc.)

TESE DE DOUTORADO

**Microencapsulamento de compostos bioativos da uva (*Vitis labrusca* L.) e
efeito do tratamento pós-colheita com UV-C em uvas Bordô.**

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

DOUTORA EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

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

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

Por:

Pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Caciano Pelayo Zapata
Noreña
Orientador - UFRGS

Prof^a. Dr^a. Rosane Rech
Coordenadora do Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnolgia de
Alimentos (PPGCTA)

Prof. Dr. Rui Carlos Zambiasi
Banca - UFPel

Prof^a. Dr^a Roberta Cruz Silveira Thys
Banca - UFRGS

Prof. Dr. Vitor Manfroi
Diretor do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos
ICTA/UFRGS

Prof. Dr. Adriano Brandelli
Banca - UFRGS

Dedico este trabalho à minha querida Oma Joana Siede. Muito mais que uma grande mulher, meu maior exemplo de carinho, humildade, serenidade, força, luta, superação, amor ao próximo e à vida.

AGRADECIMENTOS

Sempre que eu pensava em quais palavras usaria para começar a escrever esta parte da minha tese, me vinha na mente a palavra caminho, e sempre acabava, de uma forma ou outra, pensando no caminho de Santiago de Compostela. Resolvi pesquisar os motivos que levam uma pessoa a percorrer esse famoso caminho, e encontrei inúmeras respostas, dentre as quais achei extremamente interessante as seguintes: buscar um sentido para a vida, se desafiar e se superar, refletir, fazer descobertas, desafiar os limites do corpo, descobrir a força emocional dentro de si. Li ainda a seguinte frase que achei interessante: “O caminho exige, do caminhante, saber seus limites, ter persistência, disciplina, companheirismo”. Entendi melhor porque esta palavra sempre me vinha à mente. O doutorado foi muito mais do que obter um grau acadêmico. No doutorado eu vivi um pouco de tudo isso, eu me redescobri, me conheci, sofri uma revolução interior, e isso só foi possível graças à ajuda que recebi, a qual quero muito agradecer.

Primeiramente eu tenho sempre que agradecer a Deus, que me deu a vida e preserva-a da melhor forma possível, me ilumina e providencia tudo que é necessário para que eu possa ter forças para seguir o caminho, que me permitiu descobrir meu amor pela fotografia e pelos pássaros, uma das forças que encontrei nos momentos mais difíceis dessa caminhada...

...e meus pais, que me ensinaram a escolher os caminhos a seguir, me ensinaram a ter fé, acreditar, e que seja qual for o caminho que eu estiver trilhando, vão estar me acompanhando com a mente e com o coração. Agradeço pelo amor, pelos ensinamentos, pela paciência, pela ajuda infinita, por tudo que já fizeram, por tudo que sempre irão fazer! E agradeço ao meu irmão Felipe, por achar um tempinho para brigar comigo mesmo estando longe! <3

No meio do caminho, eu encontrei uma pessoa que resolveu me dar a mão, e caminhar ao meu lado até o final, e até adiante, e até o próximo caminho! Todo o amor, o carinho, a presença, a força, a compreensão, a paciência e a atenção que eu precisei ele me deu. Sem pedir nada em troca, secou todas as minhas lágrimas e riu com todas as minhas risadas. Entre nós reinam três palavras: amor, companheirismo e reciprocidade! Obrigada Matias, por tudo, mas principalmente por me entender e por estar sempre do meu lado, incondicionalmente! Preguiça!

Das amizades que fiz por conta do doutorado, nunca, jamais conseguirei agradecer suficientemente a Camila! Impossível! Por me ouvir, me ajudar, me aconselhar ou me dar um chocolate. Quero que tu continues ao meu lado seja qual forem os caminhos que a gente vá seguir no futuro. E a Renata, dona da alegria mais contagiante que eu já vi, que começou o caminho comigo, e que foi uma das amizades mais sinceras que tive e tenho! Não tenho palavras para dizer o quanto vocês foram importantes para mim, o quanto vocês tornaram a caminhada mais leve e quanto eu admiro vocês! À Alessandra, que ficou comigo no lab quando todos foram saindo para seguir os seus caminhos, que me ofereceu ajuda, amizade, companhia para o chimarrão e muitas risadas! A todas as outras pessoas que fizeram parte do círculo de amizades, a Marcela e a Chaline, que acompanharam de perto a minha caminhada, Tenisa, Tainara, Luz, Liliana, Flávio, Ana, Nina, enfim, todos aqueles que ajudaram a divertir os dias mais difíceis!

Mas não se trilha esse caminho sem pessoas que vão te ajudando a encontrar a direção. Obrigada ao meu orientador Caciano, por me ensinar lições importantes para toda a vida, seja qual for o caminho que irei seguir daqui para frente! Obrigada as ICs do lab, principalmente à Júlia, que me acompanhou em boa parte do trabalho. Obrigada aos funcionários e bolsistas do ICTA, por toda ajuda sempre, principalmente a Ana Raisa, Silvana, Jennifer, Isaías, Fernando, Alexandre, Diogo e Edgar. Obrigada a CAPES, CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro, à UFRGS e ao PPGCTA pela oportunidade de trilhar o caminho.

Obrigada a todos aqueles que estiveram comigo em vários trechos. Agradeço a minha Oma, por ter tido forças suficientes para continuar alegrando a minha vida até aqui! Minhas lindas afilhadas que enchem a minha vida de amor, Lara e Larissa. A minha madrinha Nélia. Minha amiga e afilhada Neidiane, que me apoia sejam quais forem as minhas escolhas. Ao restante da minha família, e à família do Matias. A todos os outros amigos, a todas as pessoas, que esperaram por algo que não pude dar nesse tempo, mas que entenderam a minha ausência, e não desistiram de mim...

Gratidão e um pedacinho do meu coração!

*“Well, there’s things that never will be right I know
And things need changin’ everywhere you go
But ‘til we start to make a move to make a few things right
You’ll never see me wear a suit of white”*

Johnny Cash

RESUMO

O Rio Grande do Sul é o maior produtor de uvas do Brasil, e as cultivares de *Vitis labrusca* representam mais de 90% da produção, dentre as quais se destacam as variedades Isabel e Bordô, que se caracterizam por conter altas concentrações de polifenóis, principalmente antocianinas, que exibem propriedades antioxidantes e que podem ser usados como corantes em alimentos. Entretanto, a utilização destes compostos em alimentos se torna difícil devido à sua alta instabilidade, e uma das formas de proteger estes compostos das condições adversas do meio é a microencapsulação. O bagaço da uva, proveniente da fabricação de sucos e vinhos, contém uma elevada concentração de polifenóis, e é composto em grande parte pela casca da uva. Dessa forma, este trabalho de Tese, teve como primeiro objetivo a extração dos polifenóis da casca das uvas Isabel e Bordô, e seu microencapsulamento utilizando diferentes materiais de parede, o qual foi dividido em três etapas. Na primeira etapa, foi realizada a separação dos compostos fenólicos mediante extração aquosa em meio ácido da casca de uva Isabel. A seguir, o extrato foi submetido à atomização para obtenção das micropartículas, utilizando goma arábica, β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina como agentes encapsulantes, combinadas em concentrações máximas de 5%. Os pós obtidos foram avaliados quanto aos fenóis totais, antocianinas monoméricas totais, flavonoides, flavanols, atividade antioxidante (DPPH, CUPRAC e HRSA), cor, umidade, atividade de água, solubilidade, higroscopicidade, temperatura de transição vítrea e microestrutura. De forma geral, os pós obtidos apresentaram alta higroscopicidade e baixa temperatura de transição vítrea, além de aglomeração das partículas. O tratamento elaborado com 3% de goma arábica e 2% de β -ciclodextrina foi considerado o melhor, com maior retenção de flavonoides (67,2%), flavanols (51,1%), atividade antioxidante por DPPH (55%) e CUPRAC (58,8%), menor higroscopicidade (17,33%) e maior temperatura de transição vítrea (32,85 °C). Na segunda etapa, o extrato fenólico aquoso acidificado da casca de uva Bordô foi atomizado e liofilizado para a obtenção das micropartículas, utilizando goma arábica, goma guar parcialmente hidrolisada e polidextrose, em um total de 10% de material de parede. Os pós obtidos foram avaliados quanto ao conteúdo de fenóis totais, antocianinas monoméricas totais, atividade antioxidante (DPPH, CUPRAC, HRSA), cor, umidade, atividade de água, solubilidade, higroscopicidade, temperatura de transição vítrea, tamanho de partícula e microestrutura. Foram obtidas altas retenções, maiores que 80% para fenóis totais e antocianinas monoméricas totais, e entre 45 e 84% para atividade antioxidante em todos os tratamentos estudados. Os pós atomizados tiveram menor umidade, atividade de água e tamanho de partícula, maior solubilidade e temperatura de transição vítrea, além de melhores características morfológicas do que os pós liofilizados. O pó obtido por atomização com 5% de goma guar parcialmente hidrolisada e 5% de polidextrose foi considerado o melhor tratamento, visto que teve maior retenção de fenóis totais (89,0%), antocianinas monoméricas totais (99,5%) e atividade antioxidante por DPPH (57,3%) e CUPRAC (83,2%). Na terceira etapa, dispersões de extrato de casca de uva Bordô com 5% de goma guar parcialmente hidrolisada e 5% de polidextrose, que foi considerado o melhor tratamento dentre todos os elaborados com uva Isabel e Bordô, foram atomizadas e liofilizadas para obtenção das micropartículas, que foram submetidas a testes acelerados de armazenamento (umidades relativas de 75 e 90% em temperaturas de 35, 45 e 55 °C) e de simulação de digestão gastrointestinal (divididos em duas fases: fase gástrica e fase

intestinal). Foram avaliados os conteúdos de fenóis totais, antocianinas monoméricas totais e atividade antioxidante por ABTS. Quanto às provas aceleradas, a temperatura teve um efeito significativo na diminuição no conteúdo de fenóis, com retenções de 82,5% a 93,5%. Na redução do conteúdo de antocianinas monoméricas totais foi significativo o efeito da temperatura, umidade relativa e tempo, com retenções de 3,9 a 42,3%. A redução do teor de antocianinas monoméricas totais exibiu cinética de primeira ordem, e os valores de z e E_a indicaram que o pó liofilizado é mais instável às mudanças de temperatura, quando utilizadas temperaturas mais elevadas. Por outro lado, os valores de D e $t_{1/2}$ foram muito próximos entre os dois pós, o que indica pouca diferença de estabilidade entre eles nas temperaturas utilizadas neste estudo. Os parâmetros termodinâmicos indicaram que a reação foi endotérmica e não espontânea. A atividade antioxidante teve comportamento similar ao dos fenóis totais, com retenção final de 38,5 a 59,5%. Quanto à simulação da digestão gastrointestinal os dois pós tiveram liberação de fenóis de aproximadamente 80% na fase gástrica, e aumento significativo da liberação na fase intestinal, onde, na última hora de experimento, o pó atomizado teve 90,6% de liberação e o liofilizado 94,9%. Comportamento similar foi observado para a atividade antioxidante, onde o pó atomizado e o pó liofilizado tiveram percentuais próximos a 50% na fase gástrica e aumento significativo na fase intestinal, onde na última hora do experimento o pó atomizado teve 69,4% da atividade antioxidante e o pó liofilizado 67,8%. Entretanto, as antocianinas monoméricas tiveram redução significativa de aproximadamente 50% do seu conteúdo na fase intestinal, onde, na última hora de experimento, o pó atomizado teve 39% de liberação e o liofilizado 39,8%. O método de obtenção das micropartículas não influenciou na estabilidade dos pós, tanto nos testes acelerados de armazenamento quanto na simulação da digestão gastrointestinal. Como segundo objetivo foi avaliado o efeito da irradiação UV-C em uvas Bordô, como tratamento pós-colheita. Foram estudadas duas safras de anos diferentes, sendo que na primeira as uvas foram submetidas a 0, 0,5, 1, 4, 10 e 30 minutos de irradiação (120 W) e armazenadas a 22 °C, enquanto que na segunda safra as uvas foram submetidas à irradiações com UV-C (120 W) por 0, 0,5 e 4 minutos, combinada com ultrassom (40 kHz) por 5 minutos e armazenadas a 22 °C. Na primeira safra, as uvas não apresentaram aumento dos compostos bioativos e da atividade antioxidante. Entretanto, na segunda safra, os resultados indicaram o aumento significativo no conteúdo de fenóis totais, antocianinas monoméricas totais e na atividade antioxidante para as uvas irradiadas por 0,5 minutos com UV-C e para as irradiadas com UV-C por 4 minutos em combinação com ultrassom por 5 minutos, com aumentos de 1,2 a 2,0 vezes em relação ao controle, não havendo mudanças significativas na cor das uvas irradiadas.

Palavras-chave: uva, polifenóis, antocianinas, microencapsulamento, estabilidade, irradiação UV-C.

ABSTRACT

The state of Rio Grande do Sul, Brazil, is the greatest producer of grapes in the country. *Vitis labrusca* cultivars constitute more than 90% of production, underscoring Isabel and Bordô varieties, featuring high concentrations of polyphenols, especially antioxidant anthocyanins used as food coloring. Since the use of the compounds in food is rather difficult due to their unstableness, microencapsulation is one of the methods to protect the compounds from adverse environmental condition. Grape pomace, the residue from the manufacture of juice and wine, has high polyphenol concentration and is mainly formed by grape skin. Current thesis aims at extracting polyphenols from the skin of Isabel and Bordô grape varieties and their microencapsulation by different wall materials. Research was divided into three stages. The first stage comprised the separation of phenolic compounds by water extraction in the acid medium of the skin of the Isabel grape variety. The extract was spray-dried for microparticles by means of gum arabic, β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin as encapsulating agents at maximum 5% concentrations. Powders were assessed for total phenols, total monomer anthocyanins, flavonoids, flavanols, antioxidant activity (DPPH, CUPRAC and HRSA), color, humidity, water activity, solubility, hygroscopicity, glass transition temperature and micro-structure. As a rule, the powders featured high hygroscopicity, low glass transition temperature and particle agglomeration. Treatment with 3% of gum arabic 3% and 2% of β -cyclodextrin was the best, with the highest retention rate of flavonoids (67.2%), flavanols (51.1%), antioxidant activity, and with DDPH (55%) and CUPRAC (58.8%), lowest hygroscopicity (17.33%) and highest glass transition temperature (32.85 °C). In the second stage the acidified water phenolic extract from the Bordô grape skin was spray-dried and freeze-dried for microparticles with gum arabic, partially hydrolyzed guar gum and polydextrose, with a total 10% of wall material. Powders were assessed for total phenols, total monomer anthocyanins, antioxidant activity (DPPH, CUPRAC, HRSA), color, humidity, water activity, solubility, hygroscopicity, glass transition temperature, particle size and micro-structure. High retentions occurred, with more than 80% for total phenols and total monomer anthocyanins; and between 45 and 84% for antioxidant activity in all treatments under analysis. Atomized powders had lower humidity, water activity and particle size, greater solubility, higher glass transition temperature, and better morphological characteristics than the freeze-dried powders. The powder obtain by spray-dried with 5% of partially hydrolyzed guar gum and 5% of polydextrose was the best treatment due to greater retention of total phenols (89.0%), total monomer anthocyanins (99,5%) and antioxidant activity for DPPH (57.3%) and CUPRAC (83.2%). The third stage comprised dispersions of the extract of the Bordô grape skin with partially hydrolyzed guar gum 5% and polydextrose 5%, or rather, the best treatment among those prepared with Isabel and Bordô grapes. Dispersions were spray-dried and freeze-dried to obtain microparticles which underwent fast storage tests (relative humidity rates 75 and 90% at 35, 45 and 55 °C) and gastrointestinal digestion simulations (divided into two phases: gastric and intestinal phases). Total phenols, total monomer anthocyanins and antioxidant activity for ABTS were evaluated. Fast tests revealed that temperature had a significant effect on the decrease in phenol contents, with 82.5 - 93.5% retentions. Temperature, relative humidity and time were significant on the reduction of total monomer anthocyanin contents, with 3.9 – 42.3% retentions. Decrease in total monomer anthocyanin rates revealed a first order kinetics, whilst z and E_a rates indicated highly unstable freeze-dried powder for

changes in temperature when higher temperatures are employed. On the other hand, D and $t_{1/2}$ rates were very close between the two powders, revealing slight stability difference between the two at temperatures employed in current study. Thermodynamic parameters demonstrated an endothermic and non-spontaneous reaction. Antioxidant activity behaved similarly to total phenols with a final retention between 38.5 and 59.5%. In the case of gastrointestinal digestion simulation, the two powders released 80% phenols during the gastric phase and a significant increase in release during the intestinal phase in which spray-dried and freeze-dried powders had 90.6% and 94.9% release during the last hour of the experiment. A similar behavior was detected for antioxidant activity in which spray-dried and freeze-dried powders featured 50% during the gastric phase and a significant increase during the intestinal one, with 69.4% and 67.8% of antioxidant activity respectively by the spray-dried and freeze-dried powders during the last hour of the experiment. However, monomer anthocyanins had a significant 50% reduction of contents in the intestinal phase in which the spray-dried and freeze-dried powders had 39% and 39.8% release respectively during the last hour of the experiment. The methods for obtaining microparticles failed to affect the stability of the powder in fast storage tests and in gastrointestinal simulation tests. Current research also evaluated the effect of UV-C irradiation on Bordô grapes for post-harvest treatment. Two harvests in two different years were analyzed: grapes of the first harvest underwent 0, 0.5, 1, 4, 10 and 30 minutes irradiation (120 W) and stored at 22 °C, whereas grapes of the second harvest underwent UV-C irradiations (120 W) during 0, 0.5 and 4 minutes, coupled to ultrasound (40 kHz) for 5 minutes and stored at 22 °C. The former did not have any increase in bioactive compounds and antioxidant activity. Results of the latter, however, demonstrated a significant increase in total phenols, total monomer anthocyanins and antioxidant activity for grapes irradiated during 0.5 minutes with UV-C and for those irradiated with UV-C for 4 minutes plus ultrasound for 5 minutes. There was 1.2 - 2.0 times increase when compared to control, with no change in color in the irradiated grapes.

Keywords: grapes, polyphenols, anthocyanins, microencapsulation, stability, UV-C irradiation.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
OBJETIVOS	17
Objetivo geral	17
Objetivos específicos	17
CAPÍTULO 1: Fundamentos teóricos e revisão bibliográfica	18
1 Uva	19
2 Compostos fenólicos	21
2.1 Classificação dos fenóis.....	23
2.1.1 Antocianinas	27
2.2 Atividade antioxidante	31
2.3 Aumento do teor de polifenóis em plantas através de estresse.....	36
2.4 Estabilidade dos compostos fenólicos	37
2.4.1 Digestão gastrointestinal.....	39
3 Microencapsulação	41
3.1 Microencapsulação por atomização.....	44
3.2 Microencapsulação por liofilização.....	47
3.3 Agentes encapsulantes.....	48
3.3.1 Goma arábica	49
3.3.2 Ciclodextrinas	50
3.3.3 Goma guar parcialmente hidrolisada	53
3.3.4 Polidextrose	55
CAPÍTULO 2: Aplicação de goma arábica, β-ciclodextrina e hidroxipropil-β-ciclodextrina na obtenção de micropartículas de extrato fenólico de casca de uva (<i>Vitis labrusca</i> L.) Isabel	57
CAPÍTULO 3: Microencapsulation of grape (<i>Vitis labrusca</i> var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents	85
CAPÍTULO 4: Estabilidade de micropartículas obtidas a partir de extrato fenólico de casca de uva Bordô (<i>Vitis labrusca</i> L.) utilizando polidextrose e goma guar parcialmente hidrolisada como materiais de parede	110
CAPÍTULO 5: Efeito do tratamento com irradiação UV-C e banho ultrassônico na pós-colheita de uvas (<i>Vitis labrusca</i> L.) Bordô	143
CAPÍTULO 6: Considerações finais	168

6.1 Discussão geral.....	169
CONCLUSÕES	175
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	177
REFERÊNCIAS.....	178
APÊNDICE A.....	197

INTRODUÇÃO

O interesse pelo efeito da dieta na saúde humana vem aumentando nos últimos anos. O desenvolvimento científico têm resultado em uma abordagem diferente para a relação entre alimentação e saúde, tornando mais evidente que os alimentos contêm um elevado número de compostos que exibem ação protetora no organismo humano. Estudos indicam que a ingestão de frutas e vegetais está associada com a redução do risco de inúmeras doenças crônicas, tais como doenças cardiovasculares, diabetes, catarata, câncer, obesidade, reumatismo, dentre outras (Kaur e Kapoor, 2001; Prior, 2003; Rekhy e McConchie, 2014; Sangita et al., 2013; Wargovich, 2000). Entretanto, o ritmo de vida cada vez mais acelerado, e a redução do tempo livre para o preparo de refeições, exigem que a indústria de alimentos desenvolva alimentos processados, prontos para o consumo, mas que atendam às necessidades dos consumidores, também em relação à saúde.

A uva é uma fruta amplamente cultivada no Brasil, e pode ser consumida *in natura*, sendo muito apreciada pelo seu sabor, ou destinada à elaboração de inúmeros produtos na indústria de alimentos, tais como vinhos, sucos e geleias. Além disso, é das frutas mais ricas em compostos fenólicos, que estão distribuídos na polpa, sementes e casca. O Rio Grande do Sul é responsável por cerca de 90% da uva produzida no país, sendo que no ano de 2015 foram colhidas mais de 700 mil toneladas de uva, das quais, aproximadamente 90% são variedades americanas e híbridas (IBRAVIN, 2016). Estima-se que para cada 100 litros de vinho produzidos, obtém-se cerca de 18 quilogramas de bagaço, que é formado por um grande percentual de casca, sendo a maior parte dele destinado para adubo e alimentação animal, possuindo baixo valor agregado (Rockenbach et al., 2011a). Neste resíduo ainda se tem um elevado conteúdo de compostos fenólicos, devido à incompleta extração que se tem durante a produção de vinho (Rockenbach et al., 2011b).

Compostos fenólicos são metabólitos secundários produzidos pelas plantas frente a condições adversas, como ataque de patógenos, estresse hídrico e radiação por UV (Crozier, Clifford e Ashihara, 2006). A utilização da irradiação com UV-C vem sendo estudada como um tratamento pós-colheita aplicado a fim de aumentar o conteúdo de compostos fenólicos de diversos vegetais. Os polifenóis possuem ação antioxidante, pois atuam como agentes redutores e doadores de hidrogênio, estabilizando radicais livres, e evitando assim, a propagação ou iniciação de reações

oxidativas (Rice-Evans, Miller e Paganga, 1997). As reações oxidativas que ocorrem no organismo são consequência da formação de radicais durante o processo respiratório, além de fatores exógenos (Kaur e Kapoor, 2001). A presença de compostos antioxidantes como os fenóis, contribui com a redução do estresse oxidativo e conseqüentemente a incidência de doenças relacionadas a este fenômeno.

Além da sua atividade antioxidante, alguns compostos fenólicos, como as antocianinas, são considerados potenciais corantes naturais, que podem ser utilizados na indústria de alimentos em substituição aos corantes sintéticos. Entretanto, a desvantagem na aplicação de compostos fenólicos como aditivos em alimentos processados, está no fato de que os polifenóis são altamente instáveis frente a diversos fatores, como altas temperaturas, presença de luz, oxigênio, enzimas oxidativas, metais e mudanças de pH, que podem estar presentes no processamento dos alimentos (Bakowska, Kucharska e Oszmianski, 2003; Fang e Bhandari, 2011).

A estabilidade dos polifenóis pode ser aumentada através da microencapsulação, que é uma técnica na qual ingredientes sensíveis são revestidos por um material de parede, que vai proteger as moléculas instáveis e controlar a liberação dos mesmos (Bakowska-Barczak e Kolodziejczyk, 2011). Além disso, dependendo da técnica utilizada, a microencapsulação resulta na conversão de líquidos em pós, que podem ser facilmente manipulados, aumentando o potencial de aplicação destes compostos em alimentos, como bebidas, sorvetes, iogurtes, pães, molhos, dentre outros (Bakar et al., 2013; Bakowska-Barczak e Kolodziejczyk, 2011). Dentre as técnicas mais utilizadas para microencapsulação de compostos alimentícios estão a atomização e a liofilização, que resultam na formação de microesferas. As microesferas constituem-se de uma fase contínua de um ou mais polímeros, onde se encontram dispersas as partículas encapsuladas (Mathiowitz, Kreitz, e Brannon-Peppas, 1999). A dispersão dos compostos é feita antes do processo de secagem, através da mistura dos agentes encapsulantes com o extrato contendo o composto de interesse. Quando utilizados agentes encapsulantes de cadeia cíclica, como as ciclodextrinas, ocorre a formação de complexos de inclusão, que posteriormente são submetidos a processos de secagem como a atomização e a liofilização, finalizando assim o processo de microencapsulamento.

Existem muitos cuidados que devem ser tomados na elaboração de produtos microencapsulados para aplicação na indústria de alimentos. Um deles é a não utilização de solventes orgânicos, visto que, apesar dos solventes serem eliminados durante o processo, resíduos podem permanecer no produto final, conferindo um potencial efeito tóxico ao pó (Fathi, Martín e McClements, 2014). Outro cuidado a ser observado, é com o tipo de agente encapsulante que vai ser utilizado, que deve ser de grau alimentício e ter características adequadas (Desai e Park, 2005), dentre os quais, uma boa opção são os carboidratos com ação prebiótica.

Dentro deste contexto, este trabalho teve como finalidade elaborar micropartículas a partir de extrato aquoso de casca de uva (*Vitis labrusca* L.), com potencial para aplicação em produtos alimentícios, e também, avaliar o efeito do tratamento pós-colheita com UV-C no conteúdo fenólico de uvas Bordô. Este trabalho está estruturado em capítulos, onde o capítulo 1 apresenta o embasamento teórico pertinente ao desenvolvimento da pesquisa. Os capítulos 2, 3, 4 e 5 estão na forma de artigos científicos, os quais descrevem as justificativas, as metodologias empregadas durante a condução dos experimentos, os resultados obtidos e a discussão dos mesmos. O capítulo 6 é constituído das considerações finais, que compreende uma discussão geral do trabalho, as conclusões e perspectivas de trabalhos futuros. No Apêndice A está um artigo que foi elaborado nos primeiros semestres do curso de doutorado, a fim de aperfeiçoar os conhecimentos estatísticos que foram aplicados no decorrer da pesquisa.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Elaborar e caracterizar micropartículas de extrato fenólico aquoso de casca de uva Bordô e Isabel utilizando diferentes carboidratos como material de parede, assim como avaliar o efeito da radiação UV-C como tratamento pós-colheita de uvas Bordô.

Objetivos específicos

- Obter micropartículas a partir do extrato fenólico aquoso de casca de uva Isabel utilizando goma arábica, β -ciclodextrina, hidroxipropil- β -ciclodextrina e a combinação delas, através da formação de complexos de inclusão e posterior atomização.
- Obter micropartículas a partir do extrato fenólico aquoso de casca de uva Bordô utilizando goma arábica, goma guar parcialmente hidrolisada, povidexose e a combinação delas, através das técnicas de atomização e liofilização.
- Caracterizar as micropartículas quanto ao teor de compostos bioativos, atividade antioxidante, cor, propriedades físicas e microestrutura.
- Definir as melhores condições dentre os tratamentos testados e avaliar a estabilidade em condições aceleradas de armazenamento, assim como o efeito da simulação da digestão gastrointestinal.
- Estudar o possível aumento do teor de compostos fenólicos nas uvas cv. Bordô mediante tratamento com UV-C.

CAPÍTULO 1

Fundamentos teóricos e revisão bibliográfica

1 Uva

A uva é uma das frutas mais cultivadas e consumidas no mundo, tanto *in natura* quanto processada, sendo os maiores produtores e consumidores os Estados Unidos da América, o Brasil e a Espanha (FAOSTAT, 2012; OIV, 2013; Xu et al., 2010). As primeiras variedades de uva que foram introduzidas no Brasil pelos portugueses, no século XVI, eram uvas finas (*Vitis vinifera*) originárias da Europa. O início da produção de uva em grande escala no país ocorreu em 1875, com a chegada dos imigrantes italianos ao Brasil, com a consequente melhora da qualidade dos vinhos produzidos e aumento da importância econômica dessa atividade (IBRAVIN, 2014).

Cultivares de origem americana, principalmente de *Vitis labrusca*, foram a base para o desenvolvimento da cultura no Brasil. As variedades americanas de *Vitis labrusca* L., são amplamente cultivadas no Brasil, representando mais de 80% da quantidade de uva utilizada para processamento de sucos e outros produtos, sendo as cultivares mais comuns a Isabel, Bordô, Niágara e Concord (Burin et al., 2014; Nixdorf e Hermosín-Gutiérrez, 2010; Toaldo et al., 2013). Essas variedades, assim como a Niágara, apresentam boa adaptação às condições do clima mais temperado presente no sul do Brasil (Burin et al., 2014). De acordo com o IBRAVIN (Instituto Brasileiro do Vinho), o Rio Grande do Sul é responsável por cerca de 90% da uva produzida no país, sendo que no ano de 2015 foram colhidas mais de 700 mil toneladas de uva. Deste total, 632,5 milhões de quilos são de variedades americanas e híbridas, dentre as quais a Isabel correspondeu a um total de 256,4 milhões de quilos e a Bordô 137,3 milhões de quilos (IBRAVIN, 2016).

A cultivar Bordô (Figura 1A) é uma variedade de *Vitis labrusca*, originalmente chamada de Ives Seedling (ou simplesmente Ives), Folha de Figo ou Terci, cultivada em grande parte do Brasil (Camargo, 1994; Souza e Martins, 2002). Os frutos caracterizam-se por apresentar alta resistência às doenças que normalmente atacam as *Vitis vinifera*, possuir intensa coloração, sabor e aroma foxados, menor teor de acidez e elevado teor de pectina, menor potencial de produção de açúcares quando comparado com as uvas do tipo *Vitis vinifera* (Malgarim et al., 2006; Rizzon e Link, 2006; Rombaldi et al., 2004).

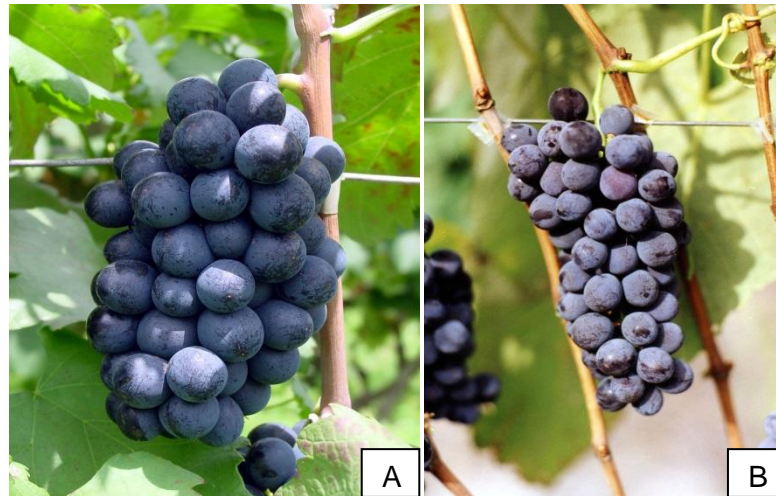


Figura 1. *Vitis labrusca* (A) cv. Bordô e (B) cv. Isabel

Fonte: Flickr (2014).

A cultivar Isabel (Figura 1B) tem características de cultivo e de frutos similares à Bordô, e é consumida como uva de mesa, e também usada para elaboração de produtos derivados, sendo a cultivar mais plantada no Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Maia e Camargo, 2005).

O alto consumo de uva no mundo é impulsionado pelo seu sabor agradável, e também pelos seus benefícios a saúde, já que é uma das maiores fontes de compostos fenólicos dentre as frutas e vegetais. Em sua polpa são encontrados, principalmente, os compostos não-flavonoides, enquanto que na casca, semente e talo, onde se concentram a maior parte dos polifenóis, são encontrados os flavonoides (Monagas, Bartolome e Gomez-Cordove, 2005). O conteúdo fenólico varia de acordo com a cultivar, composição do solo, clima, origem geográfica, práticas de cultivo, grau de maturação, exposição a doenças, dentre outros (Monagas, Bartolome e Gomez-Cordove, 2005; Obreque-Slier et al., 2010).

A uva é utilizada tanto para consumo *in natura* quanto para elaboração de produtos alimentícios, tais como: vinho, espumante, suco, néctar, vinagre, *brandy*, geleia, passas, dentre outros. Entretanto, durante o processamento da uva pelas indústrias, grande parte das cascas e sementes são eliminadas, sendo que, estas partes possuem elevada quantidade de polifenóis (Toaldo et al., 2013). Estima-se que para cada 100 litros de vinho elaborados, são produzidos cerca de 18 kg de bagaço, que é formado por um grande percentual de casca, sendo geralmente

destinado para adubo e alimentação animal, que são considerados resíduos de baixo valor agregado (Rockenbach et al., 2011a). No bagaço ainda se tem um elevado conteúdo de compostos fenólicos, devido à incompleta extração que se tem durante a produção de vinho (Rockenbach et al., 2011b). Rockenbach et al. (2011a) avaliaram o extrato do bagaço de uva Bordô e Isabel, e encontraram 63,31 mg/g e 11,22 mg/g de fenóis e antocianinas totais, respectivamente, para o bagaço de uva Bordô, e 32,62 mg/g e 1,84 mg/g de fenóis e antocianinas totais, respectivamente, para o bagaço de uva Isabel. Entretanto, muitas vezes se torna difícil o trabalho diretamente com o bagaço, principalmente devido à distância das regiões produtoras, e desta forma, trabalha-se com a casca, a fim de ter composição similar à encontrada no bagaço.

2 Compostos fenólicos

As plantas sintetizam uma grande variedade de compostos orgânicos que são classificados como metabólitos primários ou secundários. Metabólitos primários são os compostos que tem papel essencial, associado à fotossíntese, respiração, crescimento e desenvolvimento, e incluem fitoesteróis, lipídios, nucleotídeos, aminoácidos e ácidos orgânicos (Crozier, Clifford e Ashihara, 2006). Outros compostos, que se acumulam muitas vezes em altas concentrações e variedades em algumas espécies, são denominados metabólitos secundários (Crozier, Clifford e Ashihara, 2006; Wink, 2010). Nas plantas, possuem papel fundamental na proteção frente a ataques de insetos e microrganismos, sendo também responsáveis por atrair polinizadores e animais que se encarregam da dispersão de sementes. Além disso, são protetores de radiação UV, e auxiliam na fixação de nitrogênio, em algumas espécies (Crozier, Clifford e Ashihara, 2006; Taiz e Zeiger, 2004). De acordo com Crozier, Clifford e Ashihara (2006), os metabólitos secundários podem ser divididos em três grandes grupos: compostos fenólicos, terpenoides e alcaloides.

Os polifenóis são sintetizados por plantas em condições normais de desenvolvimento (Fraga, 2009; Pridham, 1960; Taiz e Zeiger, 2004) e principalmente em resposta a condições de estresse, tais como infecções, ferimentos, radiação ultravioleta, estresse hídrico, dentre outros (Nicholson e Hammerschmidt, 1992; Shahidi e Naczki, 2004). Compreendem uma grande família, que varia de ácidos fenólicos, de cadeias bastante simples, até polímeros de cadeia complexa, como taninos e lignina (Bravo, 1998; Hopkins e Hüner, 2008). Sua estrutura básica

consiste em um anel aromático hidroxilado, mas podem possuir mais anéis e mais grupamentos hidroxila, muitas vezes ligados a ácidos ou açúcares (Croft, 1998; Hopkins e Hüner, 2008).

A biossíntese de polifenóis envolve uma complexa rede de rotas metabólicas, baseadas principalmente nas rotas do chiquimato, fenilpropanoide e flavonoide (Fraga, 2009). Na via do ácido chiquímico, através de uma sequência de reações o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato sintetizam os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano (Hopkins e Hüner, 2008; Kegg, 2013). A maior parte dos compostos fenólicos naturais encontrados em plantas são resultantes da desaminação da L-fenilalanina pela fenilalanina amônia liase (PAL), formando ácido cinâmico, que por sua vez é hidroxilado e, frequentemente, metilado, para gerar ácido cumárico, e posteriormente cafeico e ferúlico (Boudet, 2007; Hopkins e Hüner, 2008; Kegg, 2013; Petersen, Hans e Matern, 2010). Esses ácidos fenólicos simples formados, geralmente não se acumulam muito nas plantas, mas são utilizados como precursores de derivados mais complexos, como flavonoides, lignanas, cumarinas, taninos, ésteres de ácidos hidroxicinâmicos, amidas e monômeros de lignina (Hopkins e Hüner, 2008; Petersen, Hans e Matern, 2010). O aumento na produção de compostos fenólicos na planta quando esta é submetida à condições de estresse, ocorre porque nessas condições a PAL tem aumento de sua atividade (Taiz e Zeiger, 2004).

Os compostos fenólicos encontram-se distribuídos de forma desuniforme nas plantas, sendo que compostos fenólicos hidrofílicos são armazenados nos vacúolos, enquanto que os lipofílicos são armazenados em canais de resina, laticíferos, tricomas, células de óleo, ou na cutícula (Winck, 2010a; Winck, 2010b). Nos alimentos, os compostos fenólicos podem contribuir com a cor, sabor (amargor e adstringência), odor e estabilidade oxidativa dos mesmos (Shahidi e Naczki, 2004). Farmacologicamente, os compostos fenólicos exibem uma variedade de propriedades benéficas à saúde, tais como antialérgica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiviral, antitrombótica e anticarcinogênica, além de exibirem efeito cardioprotetor e vasodilatador, reduz os níveis de colesterol, proporciona benefícios à visão, e ajuda na prevenção de diabetes e obesidade (Benavente-Garcia et al., 1997; Han, Shen e Lou, 2007; He e Giusti, 2010; Heinonen, Meyer e Frankel, 1998; Martineau et al., 2006; Neto, 2007; Puupponen-Pimiä et al., 2001; Shahidi e Naczki, 2004; Vuong et al., 2009; Wang, Cao e Prior, 1996; Wang e Jiao, 2000). A maioria

dos seus efeitos benéficos, como a prevenção de doenças cardíacas e câncer está relacionada à sua atividade antioxidante, visto que as espécies reativas de oxigênio (ROS), as espécies reativas de nitrogênio (RNS) e as espécies reativas de cloro (RCS) estão associadas ao desenvolvimento de doenças degenerativas (Faria et al., 2005; Shahidi e Naczki, 2004).

2.1 Classificação dos fenóis

Os fenóis se classificam em dois grandes grupos: flavonoides e não-flavonoides (Crozier, Clifford e Ashihara, 2006; Fraga, 2009).

O grupo dos flavonóides está dividido nas subclasses (Figura 2): flavonóis, flavonas, flavanonas, flavan-3-óis, antocianidinas e isoflavonas (Crozier, Clifford e Ashihara, 2006; Fraga, 2009). Os flavonoides têm em sua estrutura 15 carbonos, dispostos em três anéis: C6-C3-C6 (denominados A, B e C). Os dois anéis de seis carbonos são aromáticos (Fraga, 2009; Pietta, 2000). As classes de flavonoides são diferenciadas entre si devido ao nível de oxidação e ao padrão da substituição do anel C; já os compostos individuais, dentro de cada uma das classes, diferem entre si devido ao padrão de substituição dos anéis A e B (Pietta, 2000).

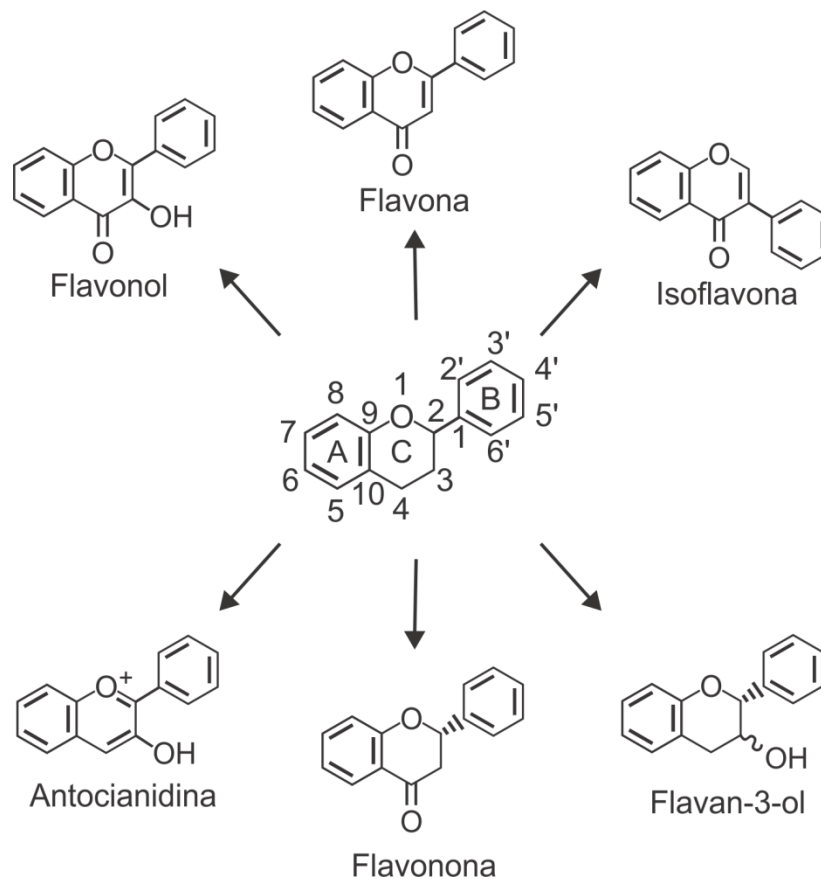


Figura 2. Estruturas químicas dos flavonoides.

Fonte: Fraga (2009).

Os flavonóis são os flavonoides mais difundidos, podendo ser incolores ou amarelos, e tem como principais representantes a miricetina, quercetina, isoramnetina e campeferol (Crozier, Clifford e Ashihara, 2006; Fraga, 2009). São comumente encontrados na forma glicosilada.

As flavonas são pouco difundidas, encontradas em alguns vegetais específicos, podendo ser encontradas hidroxilada, metilada, alquilada ou glicosilada, e as principais representantes são a apigenina e a luteolina (Crozier, Clifford e Ashihara, 2006; Fraga, 2009).

Os flavan-3-ols são o grupo mais complexo dos flavonoides, que variam de monômeros simples como a catequina e do seu isômero epicatequina, à proantocianidinas oligoméricas e poliméricas, que também são conhecidas como taninos condensados (Crozier, Clifford e Ashihara, 2006). A maior parte das proantocianidinas nos alimentos são as procianidinas, que são constituídas exclusivamente por unidades de (epi)catequina (Balentine, Wiseman e Bouwnes,

1997). Não tão comuns, as proantocianidinas contendo subunidades de (epi)afzelequina e (epi)galocatequina são denominadas propelargonidinas e prodelfinidinas, respectivamente (Balentine, Wiseman e Bouwnes, 1997). Estes compostos afetam diversos parâmetros de qualidade dos alimentos, tais como adstringência, amargor, acidez, doçura, viscosidade, aroma e formação de cor (Aron e Kennedy, 2007).

As flavanonas são altamente reativas, podendo submeter-se às reações de hidroxilação, glicosilação ou metilação (Crozier, Clifford e Ashihara, 2006; Fraga, 2009). São encontradas exclusivamente em frutas cítricas nas suas formas glicosídicas, e tem como principais representantes a naringenina, hesperitina, eriodictiol, além de outros compostos minoritários (Fraga, 2009).

As antocianidinas estão envolvidas na proteção das plantas contra a luz excessiva e também tem o importante papel de atrair polinizadores (Crozier, Clifford e Ashihara, 2006). Existem cerca de 19 antocianidinas que ocorrem naturalmente (Welch, Wu e Simon, 2008), sendo que, apenas seis são comumente encontradas em frutas: malvidina, cianidina, petunidina, peonidina, delphinidina e pelargonidina (Crozier, Clifford e Ashihara, 2006; Fraga, 2009; Francis, 2000; Scalbert e Williamson, 2000; Zhang et al., 2004). As antocianidinas geralmente encontram-se glicosiladas, sendo então denominadas antocianinas (Crozier, Clifford e Ashihara, 2006)

As isoflavonas são encontradas quase exclusivamente em plantas leguminosas, principalmente em soja, sendo comum a presença de genisteína, daidzeína e gliciteína (Crozier, Clifford e Ashihara, 2006; Fraga, 2009). As isoflavonas também podem sofrer modificações como metilação, hidroxilação ou polimerização (Fraga, 2009).

Ao grupo dos não-flavonoides pertencem os ácidos fenólicos (C6-C1) (principalmente o ácido gálico, precursor dos taninos), os hidroxicinamatos (C6-C3) e os estilbenos (C6-C2-C6) (Crozier, Clifford e Ashihara, 2006; Fraga, 2009). Os ácidos fenólicos têm como principal representante o ácido gálico, seguido pelo *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico, siríngico, dentre outros (Fraga, 2009). São os principais componentes responsáveis pela adstringência (Clifford, 2000). Estão presentes geralmente na forma não ligada, mas também compõem estruturas

complexas como ligninas e taninos hidrolisáveis (elagitaninos e galotaninos) (Fraga, 2009).

Os hidroxicinamatos, ou ácidos hidroxicinâmicos, são formados a partir do ácido cinâmico, através da via fenilpropanoide, podendo por isso, serem chamados de fenilpropanoides (Crozier, Clifford e Ashihara, 2006). Os hidroxicinamatos mais comumente encontrados são os ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico, que, nas frutas e demais vegetais, frequentemente se encontram esterificados ao ácido quínico, ácido tartárico ou carboidratos e derivados, formando os ácidos clorogênicos (Crozier, Clifford e Ashihara, 2006; Fraga, 2009; Oliveira e Bastos, 2011). Os ácidos *p*-cumárico, cafeico e ferúlico, na forma de ésteres de ácido tartárico, vão formar, respectivamente, ácidos cutárico, caftárico, e fetárico (Crozier, Clifford e Ashihara, 2006; Fraga, 2009).

Os estilbenos são fitoalexinas, que são compostos produzidos por plantas em resposta ao ataque por fungos, bactérias e vírus, ou outro tipo de estresse (Crozier, Clifford e Ashihara, 2006; Fraga, 2009). O resveratrol é o estilbeno mais comum, e ocorre como isômeros *cis* e *trans*, estando presente nos tecidos das plantas principalmente como *trans*-resveratrol-3-O-glicosídeo (Crozier, Clifford e Ashihara, 2006).

Os polifenóis encontrados na uva incluem:

- Flavonoides: antocianinas (monoglicosídeos de malvidina, cianidina, petunidina, peonidina e delphinidina), flavan-3-óis (de catequinas monoméricas a proantocianidinas, flavonois (miricetina, quercetina, campeferol, isoramnetina e seus glicosídeos) (Guerrero et al., 2009; Monagas, Bartolome e Gomez-Cordove, 2005).
- Não-flavonoides: estilbenos (principalmente o resveratrol), ácidos fenólicos e hidroxicinamatos (ácidos hidroxicinâmicos) (ácido *p*-cumárico e ácido cafeico) (Guerrero et al., 2009; Monagas, Bartolome e Gomez-Cordove, 2005; Obreque-Slier et al., 2010; Rodriguez, Aguilar e Gomez, 2006).

As antocianinas são as principais responsáveis pela coloração das uvas, encontrando-se assim, em maior concentração na casca (Monagas, Bartolome e Gomez-Cordove, 2005), enquanto os flavan-3-óis vão conferir adstringência e amargor (Gawel, 1998; Hufnagel e Hofmann, 2008; Obreque-Slier et al., 2010), podendo ser encontrados na casca e em maior quantidade nas sementes (Simón,

Hernández e Estrella, 1993; Obreque-Slier et al, 2010). Já os flavonóis vão contribuir com amargura e cor, e estão localizados na casca (Gawel, 1998; Obreque-Slier et al., 2010).

2.1.1 Antocianinas

O termo "antocianina", derivado do grego (*anthos*, flores e *kyanos*, azul), foi criado por Marquart em 1835 para designar os pigmentos azuis das flores (Lima e Guerra, 2003). Esses pigmentos são difundidos em todo reino vegetal, e são responsáveis pela coloração atraente de diversas flores e frutas. Seu espectro de cor pode variar de salmão, rosa, vermelho, magenta, violeta, roxo e azul (Cisse et al., 2009).

As antocianinas são pigmentos solúveis em água, derivados dos flavonoides através da via do ácido chiquímico (Chalker-Scott, 1999). Após sua síntese, as antocianinas são armazenadas em meio aquoso, nos vacúolos celulares (Brouillard et al., 2010). As principais funções das antocianinas em frutos e flores são: atrair agentes polinizadores e dispersores de sementes; e proteger os tecidos da planta de reações oxidativas durante diversas etapas de seu ciclo de vida, principalmente em fases iniciais de crescimento (Chalker-Scott, 1999; Fraga, 2009).

A molécula de antocianina (Figura 3) contém o íon flavílium ou 2-fenilbenzopirílium, que consiste em dois anéis aromáticos unidos por três unidades de carbono condensados por um oxigênio, e encontra-se glicosilada, ou seja, ligada a moléculas de monossacarídeos e/ou dissacarídeos (Francis, 1989). As antocianinas podem ser encontradas também aciladas, ou seja, em alguns casos também pode haver ácidos alifáticos (malônico, málico, succínico, oxálico, etc) ou aromáticos (p-cumárico, cafeico, ferúlico, gálico, p-hidroxibenzóico, etc) ligados aos mono ou dissacarídeos (Clifford, 2000; He e Giusti, 2010).

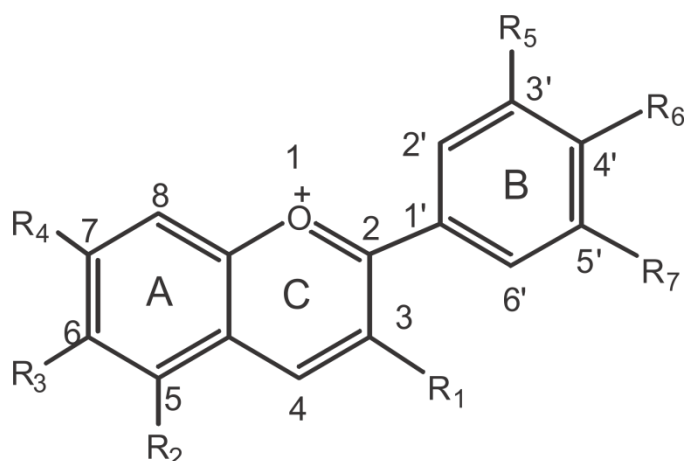


Figura 3. Estrutura genérica das antocianinas.

Fonte: Castañeda-Ovando et al. (2009).

As diferenças que caracterizam cada antocianina são o número e a posição de hidroxilas que a molécula contém e o grau de metilação destes grupos (Tabela 1); a natureza, posição, número e tipo de açúcar ligado à molécula; a natureza e o número de ácidos alifáticos ou aromáticos ligados ao carboidrato (Francis, 1989; Mazza e Brouillard, 1987).

Tabela 1. Substituições padrão do cátion flavílium formando as principais antocianidinas encontradas na natureza.

Antocianidina	Substituição padrão							Cor
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	
Cianidina	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Vermelho/laranja
Delfinidina	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Azul/vermelho
Malvidina	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	Azul/vermelho
Pelargonidina	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Laranja
Peonidina	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	H	Laranja/vermelho
Petunidina	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	OH	Azul/vermelho

Fonte: Castañeda-Ovando et al. (2009).

A glicosilação das antocianidinas para formação das antocianinas aumenta a estabilidade e a solubilidade das mesmas. Geralmente os monossacarídeos e dissacarídeos encontrados nas antocianinas são glicose e ramnose, mas as antocianinas podem estar ligadas também à galactose, arabinose, xilose, rutinose, entre outros (Clifford, 2000; He e Giusti, 2010; Zhao, 2007). A acilação das

antocianinas, por outro lado, reduz sua solubilidade em água (He e Giusti, 2010), entretanto também aumenta a sua estabilidade (Bassa e Francis, 1987; Fossen, Cabrita e Andersen, 1998; Giusti e Wrolstad, 2003). Os ácidos orgânicos que podem ser encontrados acilados às moléculas de antocianinas compreendem uma ampla gama de compostos, classificados geralmente entre ácidos alifáticos e ácidos cinâmicos (He e Giusti, 2010; Zhao, 2007).

Em relação à coloração das antocianinas, o número de hidroxilas e grupamentos metoxilas e glicólicos presentes na estrutura influenciam a cor das mesmas. Quanto maior o número de hidroxilas e grupos glicólicos, mais azul a cor e quanto maior o número de metoxilas, mais intensa a cor vermelha. Já grupamentos hidroxila ligados ao C3, particularmente, causam mudanças de coloração do amarelo-alaranjado para o vermelho (Mazza e Brouillard, 1987). Um dos mais importantes fatores que afetam a coloração das antocianinas é o pH (Brouillard e Dubois, 1977). As antocianinas mudam sua estrutura (conformação) conforme a mudança de pH do meio (Figura 4), podendo assim, possuir diferentes colorações de acordo com o pH. Assim, as antocianinas podem ser utilizadas como um indicador natural de pH (Mebane e Rybolt, 1985). Sua maior estabilidade se dá em pH ácido (Rein, 2005), onde as antocianinas podem possuir quatro conformações diferentes: base quinoidal, cátion flavílio, carbinol pseudobase e chalcona (Bobbio e Mercadante, 2008; Brouillard et al., 2010; Brouillard e Delaporte 1977).

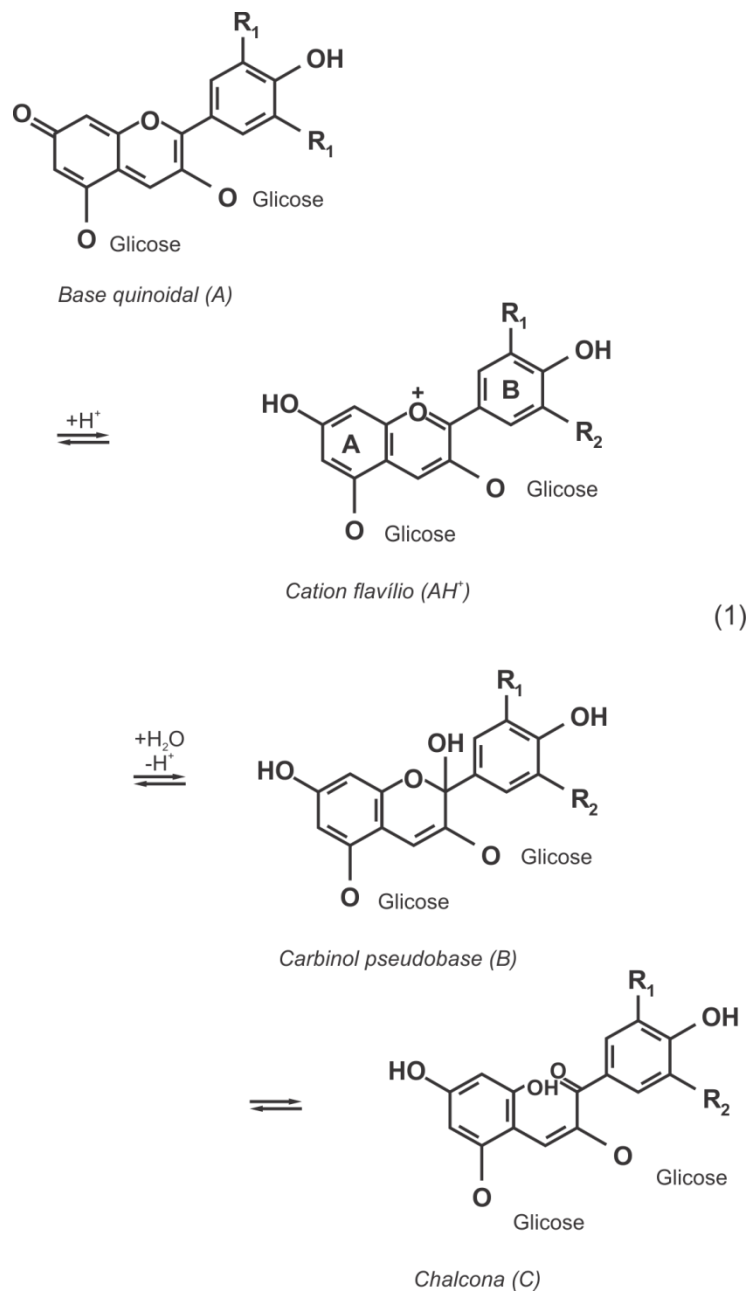


Figura 4. Estruturas moleculares das antocianinas encontradas em solução aquosa com diferentes valores de pH.

Fonte: Brouillard e Delaporte (1977).

Quando o pH está baixo (valor máximo 2,0), a forma predominante é a do cátion flavílio, de cor vermelha; com o aumento do pH (entre 2 e 4) a conformação predominante passa a ser a base quinoidal, e a cor muda para violeta/azul (Brouillard et al., 2010; Castañeda-Ovando et al., 2009; Cavalcanti, Santos e Meireles, 2011; Mazza e Brouillard, 1987). Ao mesmo tempo em que estas mudanças acontecem, ocorre a hidratação do cátion flavílio, gerando outra estrutura,

que é denominada carbinol, pseudobase ou hemiacetal (incolor), que pode ser seguida por outra transformação, que se dá através da abertura do anel formando uma nova conformação, a chalcona (incolor) (Brouillard et al., 2010; Castañeda-Ovando et al., 2009; Cavalcanti, Santos e Meireles, 2011). A perda de coloração pode ser revertida pela acidificação do meio e recuperação do cátion flavíum (Brouillard et al., 2010). Em pHs superiores à 7, dependendo de sua estrutura, as antocianinas são degradadas.

As antocianinas presentes em maior quantidade nas cascas de uvas escuras de variedades americanas, como a Isabel e a Bordô, são a malvidina-3-glicosídeo, malvidina-3,5-diglicosídeo, cianidina-3-glicosídeo, o que pode variar devido às diferentes condições de cultivo e do meio (Lago-Vanzela et al., 2011; Lima et al., 2014)

2.2 Atividade antioxidante

A oxidação é a transferência de elétrons de uma molécula para a outra, e constitui uma parte essencial da vida aeróbica e do nosso metabolismo, pois o oxigênio é o receptor de elétrons final do sistema de fluxo de elétrons que produz energia na forma de ATP (Davies, 1995; Halliwell, 1997). Embora a maior parte do oxigênio consumido por organismos aeróbios sofra redução completa para formação de água, várias reações enzimáticas e não-enzimáticas que ocorrem nas células resultam na redução parcial do oxigênio (Hermes-Lima, Storey e Storey, 1998), gerando espécies denominadas espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), tais como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxil (ROO^{\bullet}), alcóxil (RO^{\bullet}), hidroxil (HO^{\bullet}), e óxido nítrico (NO^{\bullet}) (Halliwell, 1997; Hermes-Lima, Storey e Storey, 1998; Pietta, 2000).

Quando os níveis ERO ou radicais livres são altos, ocorre um fenômeno denominado estresse oxidativo (Halliwell, 1997; Sies, 1986). Isto ocorre porque, os radicais hidroxil e alcóxil são muito reativos e podem atacar rapidamente moléculas vizinhas, causando danos que são tratados por processos de reparação (Davies, 2000; Pietta, 2000). Os ERO podem reagir com os lipídios nas membranas celulares, proteínas ou enzimas em tecidos, carboidratos e DNA, para induzir reações de oxidação que causam danos às membranas, modificação de proteínas e enzimas e danos ao DNA (Davies, 2000; Halliwell, 1997; Pietta, 2000; Rice-Evans, Miller e Paganga, 1996). Estes danos desempenham papel no envelhecimento e

indução de várias doenças degenerativas, tais como doenças cardíacas, catarata, disfunção cognitiva, reumatismo, Alzheimer, Parkinson e câncer (Halliwell, 1997; Kaur e Kapoor, 2001; Prior, 2003).

O corpo humano possui sistemas antioxidantes de defesa. Entretanto, eles nem sempre são suficientes para combater o estresse oxidativo. Dessa forma, recomenda-se a suplementação dietética de antioxidantes para reduzir o efeito cumulativo dos danos oxidativos ao longo da vida (Halliwell, 1995; Kaur e Kapoor, 2001; Nawar, 1996).

Antioxidantes são compostos ou sistemas de auto-oxidação, que inibem a formação ou interrompem a propagação dos radicais livres por um ou mais dos seguintes mecanismos: (1) Eliminando espécies que iniciam a peroxidação; (2) quelando íons metálicos de modo que eles não sejam capazes de gerar espécies reativas ou decompor peróxidos lipídicos; (3) extinguindo $O_2\bullet^-$ e prevenindo a formação de peróxidos; (4) interrompendo a reação em cadeia auto-oxidativa; (5) reduzindo concentrações localizadas de O_2 (Nawar, 1996).

Os compostos fenólicos são considerados compostos antioxidantes, pois são capazes de sequestrar ou estabilizar os radicais livres através da doação de elétrons ou átomos de hidrogênio dos grupamentos hidroxila, formando compostos estáveis que não iniciam ou propagam outras reações oxidativas, por serem estabilizados pela ressonância dos elétrons através de seus anéis aromáticos (Figura 5) (Kaur e Kapoor, 2001; Shahidi e Wanasundara, 1992).

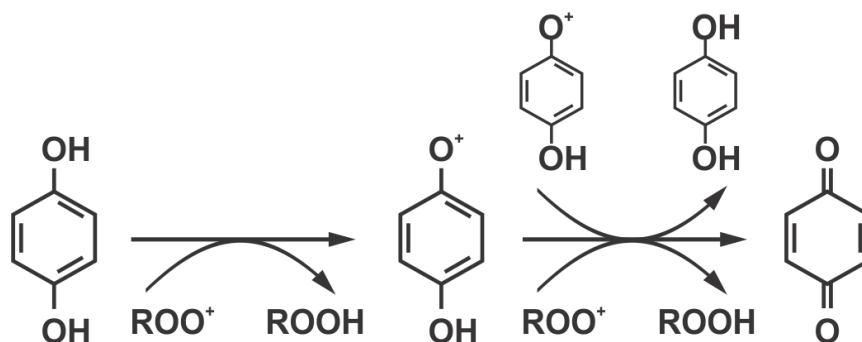


Figura 5. Mecanismo de ação antioxidante por doação de hidrogênio dos compostos fenólicos.

Fonte: Shahidi e Naczki (2004).

A presença íons de metais como cobre e ferro em um sistema pode catalisar os processos oxidativos, o que pode ocorrer através da decomposição de hidroperóxidos ou da formação de radicais hidroxil (Craft et al., 2012; Lloyd, Hanna e Mason, 1997; Toyokuni, 2002). Dessa forma, quelar esses metais é uma forma de reduzir a oxidação, e os compostos fenólicos atuam também desta forma no combate ao estresse oxidativo (Perron e Brumaghim, 2009; Ryan e Hynes, 2006), formando um complexo incapaz de promover a oxidação, atuando como antioxidantes secundários ou preventivos (Craft et al., 2012).

Existem diversas metodologias para determinação da atividade antioxidante em extratos vegetais, que podem ser divididas em duas grandes categorias: por transferência de um átomo de hidrogênio (HAT) e por transferência de um único elétron (SET) (Craft et al., 2012). A análise de atividade antioxidante por captura do radical DPPH[•] é um método espectrofotométrico que tem como princípio a captura deste radical livre estável, e redução do mesmo a hidrazina. O DPPH[•] possui coloração violeta devido à deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula, e quando uma substância que age como doadora de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH[•], a hidrazina é obtida (Figura 6), e a coloração da solução passa de violeta a amarelo pálido (Alves et al., 2010).

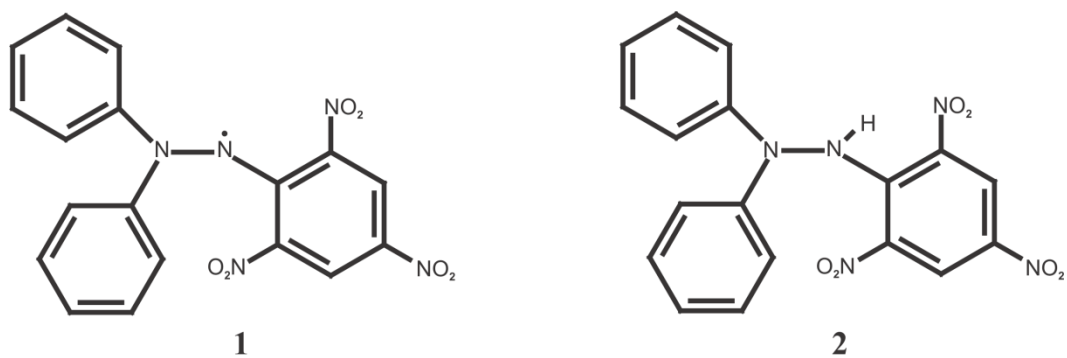


Figura 6. Estrutura radicalar (1) e não radicalar do DPPH[•] (2).

Fonte: Alves et al. (2010).

A análise antioxidante por captura do radical ABTS^{•+} também é um método espectrofotométrico, e baseia-se na capacidade do antioxidante de capturar o radical cátion ABTS^{•+}, que possui coloração verde. O antioxidante, quando em contato com este radical, pode doar um elétron ou um átomo de hidrogênio, resultando na formação de uma forma não colorida (ABTS) (Craft et al., 2012) (Figura 7).

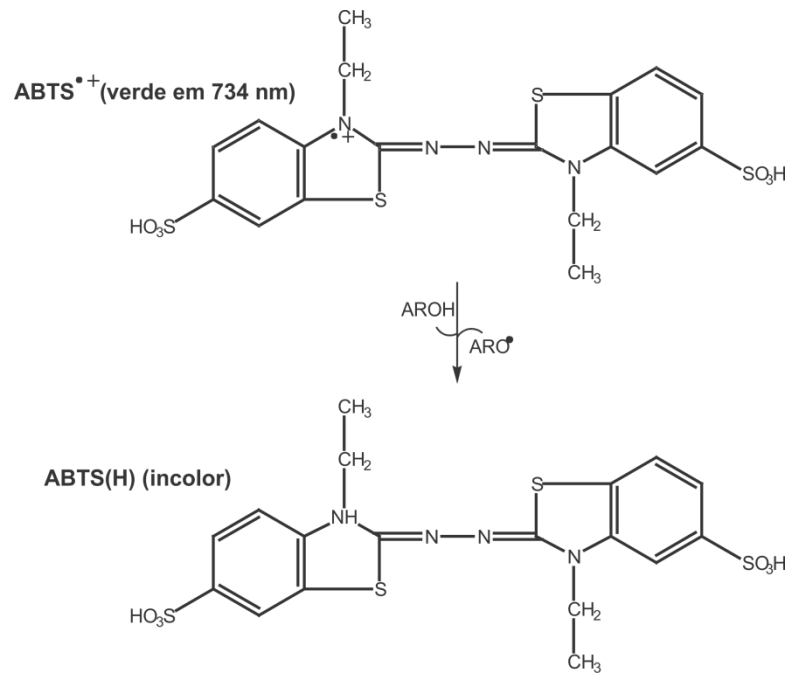


Figura 7. Conversão do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (verde em $\lambda_{\text{max}} = 734 \text{ nm}$) a uma espécie incolor ABTS(H) através de um mecanismo de transferência de um átomo de hidrogênio (HAT) de um composto antioxidante genérico (ArOH).

Fonte: Craft et al. (2012).

O método espectrofotométrico CUPRAC (*Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*) baseia-se na redução do Cu(II) para Cu(I) pelo mecanismo SET, onde na presença de antioxidantes, a reação origina um complexo Cu -neocuproína na forma reduzida, que apresenta uma coloração intensa com um máximo de absorção a 450 nm (Craft et al., 2012) (Figura 8).

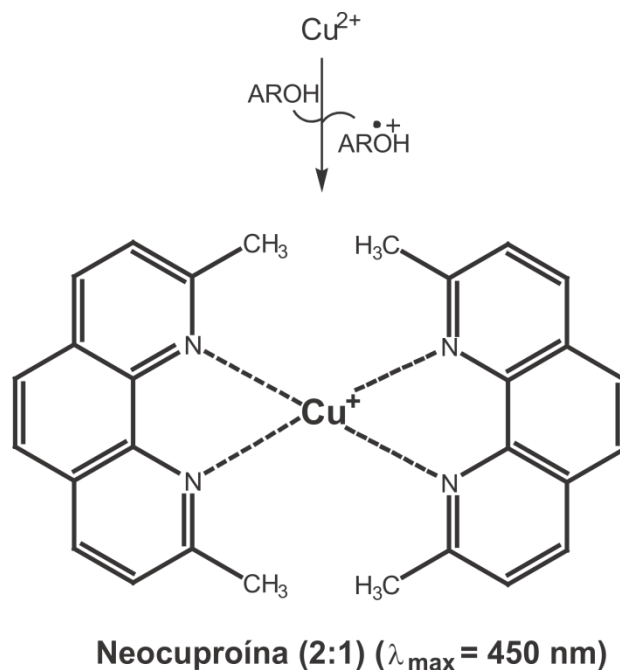


Figura 8. Redução do cobre (II) para cobre (I) pelo mecanismo SET.

Fonte: Craft et al. (2012).

O radical hidroxil pode ser sintetizado no organismo humano, e é um dos mais reativos e perigosos dentre as espécies reativas de oxigênio (Sheng e Sun, 2014). Ele pode ser gerado pela reação do complexo Fe (II) com H_2O_2 em presença de ácido salicílico (Dou et al., 2015). Os compostos fenólicos podem agir quelando os íons Fe e evitando a formação do radical, ou então, sequestrando o radical após a formação do mesmo. Existem três tipos de mecanismos de eliminação de radicais hidroxil: transferência de elétrons ($\cdot\text{OH} + \text{R} \rightarrow \text{OH}^- + \text{R}^+$), transferência de hidrogênio ($\text{RH} + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{R}^{\cdot} + \text{H}_2\text{O}$) além de adição a um anel aromático ou a uma dupla ligação ($\cdot\text{OH} + \text{R} = \text{R} \rightarrow \text{HO-RR}^{\cdot}$) (Sheng e Sun, 2014).

Diversos estudos apontam para a boa atividade antioxidante de extratos de uva inteira, de suas sementes e cascas e até mesmo do bagaço resultante da produção de vinho. Breksa et al. (2010) avaliaram a atividade antioxidante de 16 cultivares de uvas pelo método de ABTS^{\cdot} , e obtiveram valores de 7,7 a 60,9 $\mu\text{mol Trolox/g}$ (em base seca) para a uva inteira. Iacopini et al. (2008) avaliaram o extrato de cascas e sementes de 10 diferentes cultivares de uvas pelo método de DPPH^{\cdot} , e obtiveram valores de 1,74 a 3,59 mg GAE/L^{-1} para o extrato de casca de uva, e valores de 1,74 a 3,49 mg GAE/L^{-1} para o extrato de sementes de uva. Katalinic et al. (2010) avaliaram a atividade antioxidante de cascas de 14 cultivares de uva, e

obtiveram valores entre 52,8 a 291 mg GAE/L⁻¹ quando utilizado o método do DPPH*, e de 1,48 a 16,4 mM de Trolox quando utilizado o método FRAP, que é semelhante ao método CUPRAC, entretanto, utiliza ferro no lugar de cobre. Rockenbach et al. (2011b) avaliaram a atividade antioxidante do bagaço de quatro cultivares de uvas produzidas no Brasil, dentre elas as cultivares Bordô e Isabel. Pelo método de ABTS* os autores obtiveram valores de 355,06 e 193,36 µMol/g para as cultivares Bordô e Isabel, respectivamente, enquanto que para o método de DPPH*, os valores encontrados foram de 361,12 e 188,02 µMol/g para as cultivares Bordô e Isabel, respectivamente.

2.3 Aumento do teor de polifenóis em plantas através de estresse

Em condições de estresse uma série de eventos metabólicos é desencadeada nos frutos, envolvendo uma ampla variedade de compostos relacionados com a qualidade dos frutos. Acredita-se que ocorra modificação da transcrição de genes fundamentais na ativação ou repressão da transcrição de outros genes, como os relacionados com a qualidade dos frutos (Vom Endt et al., 2002). Um dos resultados é o aumento da atividade das enzimas envolvidas no processo, principalmente a PAL (Fritzemeier e Kindl, 1981; Pombo et al., 2011), com consequente aumento do conteúdo de polifenóis.

Alguns métodos vêm sendo testados em uvas e/ou outros frutos para este fim, sendo que um dos métodos mais testados é o uso de radiação UV, principalmente em uvas (Cantos et al., 2000; Cantos, Espín e Tomás-Barberán, 2001; Crupi et al, 2013; Gonzáles-Barrio et al., 2005; Guerrero et al., 2010; Liu et al., 2010). Cantos et al. (2000) observaram um aumento de até 3 vezes no teor de resveratrol em cascas de uvas cv. Napoleon irradiadas com lâmpadas UV (90 W) por 30 minutos, após 10 dias de armazenamento a 0 °C e 5 dias a 15 °C. Posteriormente os tratamentos foram otimizados na irradiação do mesmo cultivar de uva, sendo as mesmas irradiadas com potências de 30 a 510 W, em tempos de 5 segundos a 30 minutos, e armazenadas a 20 °C e 90-95% de umidade relativa por até 7 dias, e foram então obtidos teores de resveratrol até 11 vezes superiores ao controle (Cantos, Espín e Tomás-Barberán, 2001). Crupi et al. (2013) observaram aumentos superiores a três vezes de *cis* e *trans* piceido, de quercetina-3-O-galactosídeo e de quercetina-3-O-glucosídeo na casca, após irradiação por UV-C de uvas Red Globe em potência de 13,4 W por 1, 3 e 5 minutos, e armazenamento por

24, 48 e 120 horas em temperatura ambiente (25 °C) e temperatura de refrigeração (4 °C) e umidade relativa de 90-95%. Liu et al. (2010) avaliaram os efeitos do genótipo e do tipo de tecido na formação de resveratrol e piceído após irradiação de uvas por UV-C, e concluíram que a formação de estilbeno está ligado ao genótipo, sendo assim, algumas cultivares podem ser mais ou menos influenciadas. Além do genótipo, fatores como a origem geográfica, fatores agronômicos e grau de maturação estão ligados com a síntese de compostos fenólicos, como o resveratrol, que é um dos fenóis mais produzidos durante o estresse por irradiação com UV-C (Siemann e Creasy, 1992).

A ultrassonicação é outro método que vem sendo estudado no estresse de frutos para aumentar o seu conteúdo de bioativos. Hasan e Baek (2013) observaram um aumento de 7,7 vezes no teor de resveratrol em cascas de uva submetidas à ultrassonicação. Hasan et al. (2014) reportaram o aumento no teor de resveratrol de 1,15 a 1,53 vezes na elaboração de sucos a partir três diferentes cultivares de uvas submetidas à ultrassonicação. No entanto, Tiwari et al. (2010) avaliaram o efeito do ultrassom em suco de uva e observaram redução no conteúdo de algumas antocianinas.

2.4 Estabilidade dos compostos fenólicos

Dentre as características mais importantes dos compostos fenólicos, pode-se considerar como as mais importantes a sua ação antioxidante, e sua função como corante de alimentos, conferida principalmente pelas antocianinas. Sendo assim, os extratos vegetais se tornam uma alternativa para a substituição dos antioxidantes e corantes sintéticos na indústria de alimentos.

Por outro lado, os compostos fenólicos são instáveis, podendo ser degradados frente a diversas condições comumente encontradas no processamento e no armazenamento de alimentos, tais como aplicação de altas temperaturas, congelamento, pH, umidade, presença de luz, oxigênio, enzimas oxidativas, metais e íons (Bakowska, Kucharska e Oszmianski, 2003; Fang e Bhandari, 2011), ou condições encontradas no trato gastrointestinal, como pH, enzimas e presença de outros nutrientes (Serrano-Cruz et al., 2013).

Os compostos fenólicos exibem decomposição significativa frente a altas temperaturas (Hamama e Nawar, 1991), sendo que a proporção e a duração do aquecimento podem influenciar a degradação. Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto

(1997) estudaram o efeito das temperaturas de secagem na estabilidade dos polifenóis e na atividade antioxidante de bagaço de casca de uva tinta. Eles observaram que quando utilizada temperatura de 100 e 140 °C houve uma redução significativa nos polifenóis totais (18,6 e 32,6%) e de taninos condensados (11,1 e 16,6%), além de observarem um decréscimo da atividade antioxidante em 28 e 50%, respectivamente. Já a secagem a 60 °C não afetou significativamente as características das amostras.

Sabe-se que um rápido aquecimento pode facilitar a extração de compostos fenólicos, além de inativar enzimas oxidativas como a polifenoloxidase e a peroxidase, que degradam os polifenóis. Sólyom et al. (2014) observaram que utilizando temperatura de 150 °C na extração de antioxidantes de bagaço de uva é possível preservar pelo menos 90% dos compostos ativos, desde que o tempo em que o produto seja mantido a essa temperatura não seja superior a 1 minuto. Por outro lado, Cruz et al. (2007) avaliaram a estabilidade térmica dos polifenóis do bagaço de uva vermelha frente a diferentes temperaturas e tempos de aquecimento, e observaram que houve 28% de perda de compostos fenólicos quando utilizado aquecimento de 200 °C por 120 minutos.

Em relação ao congelamento, diversos estudos demonstram que ocorre uma redução no teor de compostos fenólicos, entretanto, alguns são mais degradados que outros, e sendo assim, o percentual de degradação vai depender da composição de polifenóis presentes no fruto (Ancos, Gonzáles e Cano, 2000; Chaovanalikit e Wrolstad, 2004; Turkben et al., 2010).

Quanto ao pH, Amendola, Faveri e Spigno (2010) avaliaram a estabilidade de extrato de bagaço de uva e de ácido gálico em quatro diferentes pHs (3, 5, 7 e 9) e observaram perdas maiores de polifenóis totais e atividade antioxidante nos pHs 7 e 9. Reyes e Cisneros-Zevallos (2007) avaliaram a estabilidade de antocianinas de batatas roxas e vermelhas em extrato aquoso, e observaram que a estabilidade foi maior em menores valores de pHs.

O conteúdo de água também pode influenciar o teor de compostos fenólicos, entretanto, há controvérsias em relação a isso. O teor de antocianinas pode ser influenciado negativamente pela alta umidade e atividade de água durante o armazenamento (Thakur e Arya, 1989; Tonon, Brabet e Hubinger, 2010). Por outro lado, Jiménez et al. (2012) observaram que em temperaturas acima de 100 °C a redução da atividade de água aumenta em 4 vezes a degradação das antocianinas.

A presença de luz e oxigênio são outros fatores que provocam a degradação dos compostos fenólicos. A natureza insaturada dos polifenóis torna as moléculas suscetíveis ao oxigênio molecular. Laleh et al. (2006) comprovaram a instabilidade de antocianinas frente a presença de luz. Já Castellari et al. (2000) avaliaram o efeito da adição de oxigênio em vinhos, e observaram que isto resultou em redução no teor de fenóis totais e aumento na concentração de compostos poliméricos de coloração vermelha. Benítez et al. (2006) observaram decréscimo no teor de polifenóis totais quando vinhos foram submetidos à irradiação por luz UV-visível e alta temperatura (45 °C).

Por outro lado, os compostos fenólicos são substratos para enzimas oxidativas como a polifenoloxidase (PPO) (González-Barrio et al., 2005). A PPO é amplamente distribuída em frutas e vegetais, que, na presença de oxigênio, catalisa a oxidação de monofenóis e *o*-difenois em *o*-quinonas, que posteriormente vão ser condensadas ou polimerizadas para formar compostos de coloração marrom denominados melaninas (Duangmal e Apenten, 1999; Mathew e Parpia, 1971; Yoruk e Marshall, 2003). Como observado, a estabilidade dos fenóis está relacionada com diversos parâmetros, e sendo assim, pode alterar de acordo com as outras condições presentes em um mesmo sistema.

2.4.1 Digestão gastrointestinal

O processo de digestão afeta a estabilidade e a biodisponibilidade dos compostos fenólicos, sendo que, quando os compostos fenólicos são consumidos e estão em contato com o trato gastrointestinal, eles podem ser absorvidos, degradados ou eliminados pelo sistema digestivo (Figura 9). A eficácia da absorção dos polifenóis no trato digestivo é influenciado por muitos fatores, como sua massa molecular, o pH do meio, a hidrofobicidade, o grau de polimerização e o tipo de carboidrato ligado à molécula (Tarko et al., 2009).

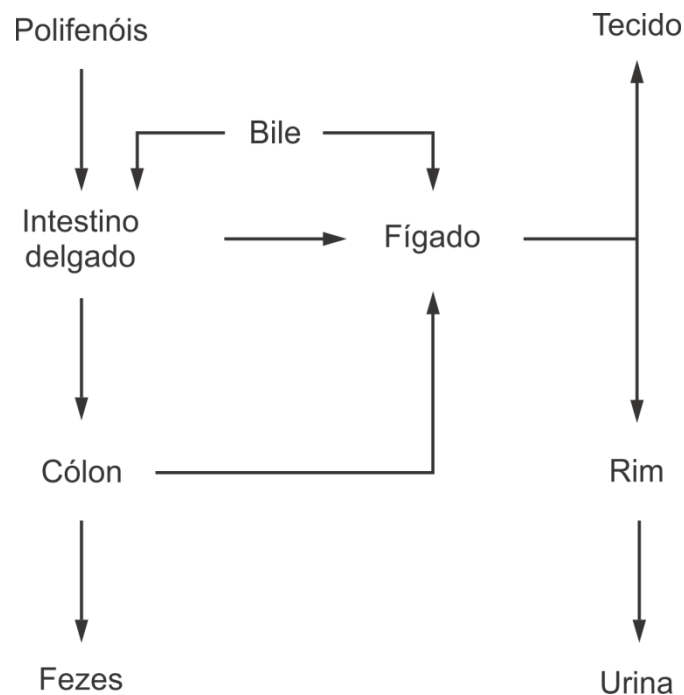


Figura 9. Possíveis rotas dos polifenóis no organismo humano.

Fonte: Shahidi e Naczk (2004).

Quanto à biodisponibilidade dos fenóis, as agliconas são absorvidas principalmente no intestino delgado, e devido ao seu caráter hidrofóbico, penetram nas membranas por difusão (Scalbert e Williamson, 2000; Tarko et al., 2009). Entretanto, a maioria dos polifenóis presentes nos alimentos se encontram na forma de ésteres, glicosídeos ou polímeros, que devem ser previamente hidrolisadas por enzimas intestinais ou pela microbiota do cólon (Manach et al., 2004). Os glicosídeos de flavonoides que passam por hidrólise enzimática e clivagem do açúcar no intestino delgado são absorvidos pelo metabolismo intestinal e transportados pelo sangue ao fígado (Scalbert e Williamson, 2000; Tarko et al., 2009). Alguns polifenóis e seus metabólitos são transportados pelo sistema circulatório do fígado para os tecidos e rins, onde são subsequentemente transformados em outros compostos ou excretados pela urina e bile (Manach et al., 2004). Os fenóis que não forem absorvidos no estômago ou intestino delgado entram em contato com a microbiota, e a eficiência de absorção é reduzida, visto que podem ocorrer degradações de agliconas em ácidos aromáticos simples (Manach et al., 2004). Estima-se que 48% dos polifenóis são digeridos no intestino delgado, 42% no intestino grosso e 10% não são digeridos, permanecendo intactos

no interior da matriz alimentar (Manach et al., 2004; Tarko, Duda-Chodak e Zajac, 2013)

Para entender melhor os possíveis efeitos benéficos dos polifenóis na saúde humana, é essencial determinar o seu comportamento após a ingestão, visto que estes compostos são ingeridos como misturas complexas imersas em uma matriz alimentar, e o processo digestivo pode afetar de diferentes formas a estabilidade e biodisponibilidade dos mesmos (Bermúdez-Soto, Tomás-Barberán e García-Conesa, 2007). Sendo assim, testes *in vitro* podem ser feitos a fim de verificar a estabilidade de um produto em condições simuladas do trato gastrointestinal.

Estudos *in vitro* da digestão de uvas Red Globe indicam que a transição do meio gástrico ácido para o meio intestinal alcalino, causa um decréscimo no conteúdo total de polifenóis, flavonoides e especialmente antocianinas (Tagliacruzchi et al., 2010). Ainda de acordo com esses autores, ao final da simulação da digestão, 62% do conteúdo de fenóis totais estava bioacessível, enquanto que avaliando somente os flavonoides, a bioacessibilidade era de 56% e as antocianinas 7,6% em relação ao conteúdo original.

3 Microencapsulação

A microencapsulação é um processo no qual pequenas quantidades de matéria sólida, líquida ou gasosa são revestidas por uma fina camada polimérica, formando cápsulas de pequeno tamanho, que protegem o composto encapsulado das condições ambientais adversas (Dubey, Shami e Rao, 2009; Poshadri e Kuna, 2010; Sri et al., 2012; Umer et al., 2012). O material encapsulado é denominado núcleo, fase interna ou recheio, enquanto que o material que forma a cápsula é o encapsulante, material de cobertura, de parede ou de membrana (Poshadri e Kuna, 2010; Sri et al., 2012; Umer et al., 2012).

Em alimentos, as micropartículas se encontram em tamanhos de 0,2 e 5000 µm (Barbosa-Cánovas et al., 2005), e podem ser classificadas em microcápsulas e microesferas de acordo com a sua estrutura (Figura 10) (Azeredo, 2005; Mathiowitz, Kreitz, e Brannon-Peppas, 1999; Suave et al., 2006). O tamanho e o tipo de partícula variam de acordo com o método de encapsulação utilizado, sendo que a atomização e a liofilização geralmente resultam em microesferas (Barbosa-Cánovas et al., 2005; Mathiowitz, Kreitz, e Brannon-Peppas, 1999). Nas microesferas existe uma fase contínua de um ou mais polímeros, onde se encontram dispersas as partículas

encapsuladas, entretanto, nas microesferas, parte das partículas do material encapsulado permanece exposto na superfície, ou seja, não existe uma parede bem definida (Azeredo, 2005; Depypere et al., 2003; Mathiowitz, Kreitz, e Brannon-Peppas, 1999). Nas microcápsulas, o núcleo é bem definido, e cercado por um filme definido e contínuo formado pelo material de parede (Azeredo, 2005; Depypere et al., 2003; Mathiowitz, Kreitz, e Brannon-Peppas, 1999; Suave et al., 2006).

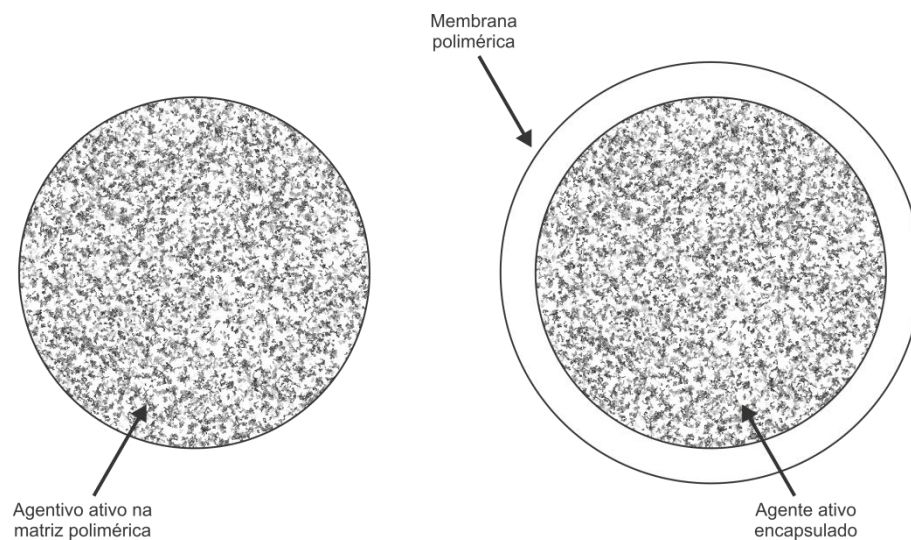


Figura 10. (A) microesfera e (B) microcápsula.

Fonte: Adaptado de Suave et al. (2006).

Entretanto, o termo encapsulação tem sido usado em seu sentido mais amplo, englobando tanto a formação de microcápsulas quanto de microesferas (Azeredo, 2005). Neste trabalho optou-se pela utilização do termo micropartícula, sendo esse um termo mais global que pode ser utilizado quando não se tem a confirmação se a micropartícula formada é uma microcápsula ou uma microesfera.

De acordo com Shahidi e Han (1993), existem seis objetivos principais para a aplicação da técnica de microencapsulação na indústria de alimentos:

- Reduzir a reatividade do material de núcleo com fatores ambientais;
- Diminuir a velocidade de evaporação ou de transferência do material de núcleo para o ambiente;
- Facilitar a manipulação do material encapsulado;
- Promover liberação controlada de uma substância;

- Mascaram sabor e odor desagradáveis de um componente;
- Promover a diluição homogênea do material encapsulado em uma formulação alimentícia.

Os principais compostos de interesse que podem ser encapsulados para utilização na indústria de alimentos são: ácidos, adoçantes, óleos, vitaminas, minerais, aromas/*flavorizantes*, conservantes, compostos antimicrobianos, aminoácidos, óleos essenciais, enzimas, microrganismos, corantes, antioxidantes, dentre outros (Barbosa-Cánovas et al., 2005; Desai e Park, 2008). Os compostos fenólicos são antioxidantes e corantes naturais instáveis frente a algumas condições, e a encapsulação dos mesmos tem a finalidade de protegê-los da luz, oxigênio, temperatura, umidade, dentre outros, além do interesse na liberação controlada dos mesmos.

Sendo as frutas e hortaliças as principais fontes de polifenóis, geralmente os mesmos são encapsulados a partir de sucos e extratos de frutas. Entretanto, a secagem destes alimentos se torna difícil devido à sua baixa temperatura de transição vítrea (T_g), que é conferida principalmente pela alta concentração de açúcar e ácidos orgânicos, fazendo com que esses extratos e sucos tenham alta pegajosidade, e fiquem facilmente aderidos nas paredes dos equipamentos e recipientes utilizados na secagem (Adhikari et al., 2004; Truong, Bhandari e Howes, 2005). A baixa T_g dos açúcares e ácidos orgânicos é atribuída à baixa massa molecular destes compostos (Bhandari e Howes, 1999), e sendo assim, o uso de agentes encapsulantes de elevada massa molecular facilita o processo de secagem, pois aumenta a T_g e reduz a pegajosidade e aderência dos extratos durante o processo, além de resultar em pós com menores higroscopiedades.

A T_g é uma propriedade dos materiais amorfos, e está diretamente relacionada com a estabilidade dos alimentos. À medida que a temperatura aumenta acima da T_g , muitas das propriedades físicas do material mudam repentinamente, dentre elas, a mais importante, é o aumento do volume de moléculas livres (Bhandari e Howes, 1999). Assim, pode-se dizer que quanto maior a temperatura de transição vítrea de um alimento, mais estável ele vai ser, visto que uma temperatura maior será necessária para que essa mudança repentina das propriedades físicas aconteça. Dessa forma, a adição de agentes encapsulantes tem como função principal proteger os compostos sensíveis, mas também favorece o processo de

secagem, e contribui com a redução da higroscopicidade e o aumento da estabilidade dos pós resultantes.

Diversos métodos podem ser utilizados na encapsulação de compostos de interesse na indústria de alimentos, dentre os quais estão o *spray drying*, *spray chilling* ou *spray cooling*, liofilização, emulsificação, coacervação, leite fluidizado, extrusão, inclusão molecular e lipossomas, co-cristalização e polimerização (Azeredo, 2005; Desai e Park, 2008; Dubey, Shami e Rao, 2009; Favaro-Trindade, Pinho e Rocha, 2008; Poshadri e Kuna, 2010; Vos et al., 2010). Os métodos utilizados no presente estudo incluíram a atomização e a liofilização.

3.1 Microencapsulação por atomização

A técnica de atomização ou *spray drying* é a técnica de encapsulação mais utilizada na indústria de alimentos (Azeredo, 2005; Desai e Park, 2008; Poshadri e Kuna, 2010; Vos et al., 2010). É um método de baixo custo, bastante flexível e que produz partículas de boa qualidade, geralmente do tipo matricial, ou seja, com o núcleo distribuído na forma de micropartículas na matriz seca do material encapsulante (Azeredo, 2005; Desai e Park, 2008; Dubey, Shami e Rao, 2009; Poshadri e Kuna, 2010; Sri et al., 2012).

O princípio do método é a dissolução do núcleo, ou seja, composto que será encapsulado, em um material de parede, formando uma dispersão, que é então atomizada em ar aquecido, promovendo a rápida remoção do solvente, formando assim, partículas na forma de pó que serão separadas do ar de secagem (Figura 11) (Gibbs, Kermasha, e Mulligan, 1999; Sri et al., 2012; Taylor, 1983; Vos et al., 2010).

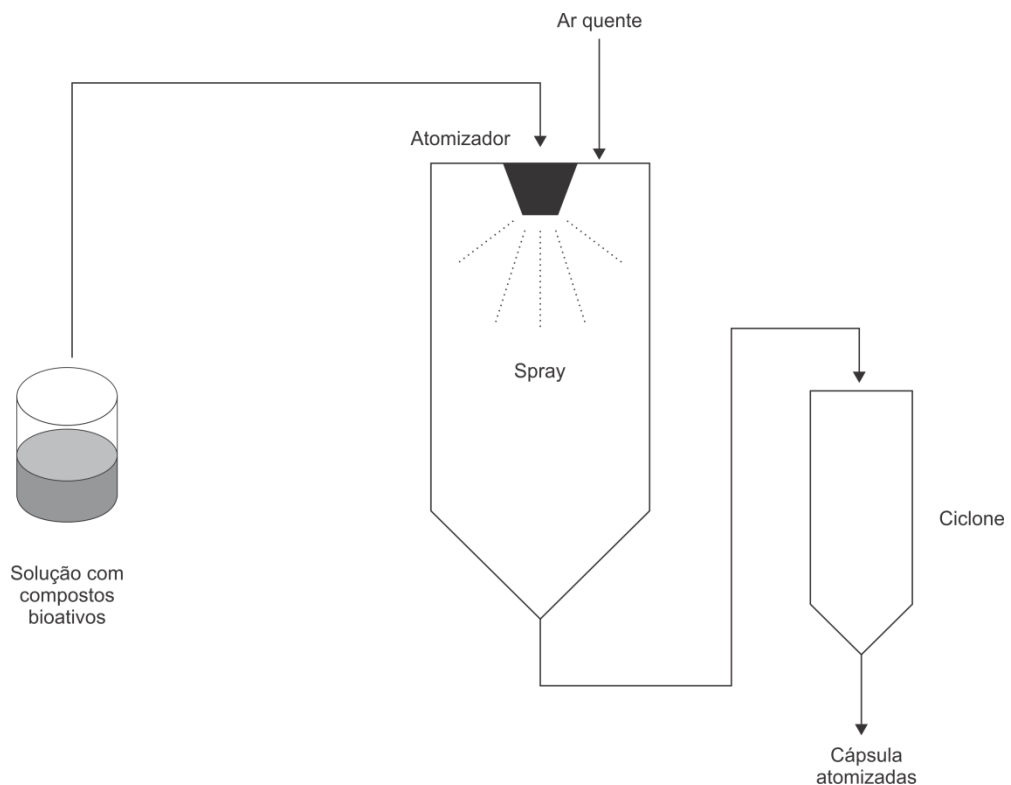


Figura 11. Processo de encapsulação por atomização.

Fonte: Adaptado de Vos et al. (2010).

Como desvantagens podem ser citadas a formação de microesferas, onde parte dos componentes bioativos podem ficar expostos na superfície da partícula, e às altas temperaturas empregadas (Vos et al., 2010). Entretanto, devido à alta relação área de superfície/volume das partículas, o ar quente promove a rápida evaporação da água, e dessa forma, o tempo de exposição é bastante curto, fazendo com que o núcleo não ultrapasse temperaturas próximas de 100 °C (Dziezak, 1988).

De acordo com Liu et al. (2004), os principais fatores que devem ser observados durante a atomização são a temperatura da solução de alimentação, a temperatura do ar de entrada, e a temperatura de saída. A temperatura de entrada do ar é diretamente proporcional à velocidade de secagem da microesfera e do teor final de água, e deve ser escolhida de maneira que não seja prejudicial ao produto e nem provoque riscos ou altos custos operacionais (Medina-Torres et al., 2013). Temperaturas de entrada muito baixas provocam uma baixa taxa de evaporação, formação de microesferas com alta densidade de membranas, alto conteúdo de água, baixa fluidez e facilidade de aglomeração; enquanto que temperaturas muito

altas causam altas taxas de evaporação, o que resulta em fissuras na membrana e, conseqüentemente, indução da liberação prematura e subsequente degradação do ingrediente ativo encapsulado ou perda de voláteis (Medina-Torres et al., 2013; Tonon et al., 2009). Em estudos foi observado que o aumento da degradação de compostos fenólicos é diretamente proporcional ao aumento da temperatura de entrada do ar (Bakowska-Barczak e Kolodziejczyk, 2011; Jiménez-Aguilar et al., 2011).

Inúmeros estudos mostram que a atomização é um método eficaz na microencapsulação de compostos fenólicos. Fang e Bhandari (2011) encapsularam suco de *bayberry* (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc) com uma solução de maltodextrina (11 °Brix), na proporção de 1:1 (suco:solução de maltodextrina), utilizando o método de atomização (150 °C), e obtiveram 96% de retenção de fenóis totais e 94% de retenção de antocianinas totais. Bakowska-Barczak e Kolodziejczyk (2011) encapsularam polifenóis de groselha-preta com maltodextrina e inulina. Os autores elaboraram extratos de groselha-preta com 12 °Brix, e adicionaram agentes encapsulantes até que o extrato atingisse 35 °Brix, e logo após atomizaram os extratos em temperaturas de 150 a 205 °C, obtendo até 86% de retenção de fenóis totais. Em estudo de encapsulação de polifenóis e antocianinas de romã, em maltodextrina (10-40%) e proteína isolada de soja (3-12%) por atomização (140-160 °C), foram observadas eficiência de microencapsulação de 53,5 a 82,9% para fenóis totais, e de 58,5 a 100% para antocianinas totais (Robert et al., 2010). Extrato concentrado de mirtilo (35% de sólidos solúveis) foi misturado a uma solução de goma Mesquita (17% p/v) na proporção de 67:33 (v/v) e atomizado a 140 e 160 °C, resultando na retenção de 96% das antocianinas monoméricas e 88% da atividade antioxidante (Jiménez-Aguilar et al., 2011). O extrato concentrado de casca de jabuticaba foi misturado a soluções de maltodextrina, goma arábica e amido modificado (totalizando 30% p/v) em uma proporção de 1:3 (v/v) e atomizados a 140, 160 e 180 °C, obtendo-se de 100,23 a 79,98% de retenção das antocianinas (Silva et al., 2013). Souza et al. (2015) encapsularam extrato concentrado de bagaço de uva Bordô com maltodextrina (10 a 30%) por atomização (130 a 170 °C), e obtiveram retenção de antocianinas monoméricas entre 88 e 97%.

3.2 Microencapsulação por liofilização

A liofilização é outra técnica muito utilizada na encapsulação de componentes alimentícios, e é indicada principalmente para compostos instáveis e termossensíveis, como aromas e microrganismos (Barbosa-Cánovas et al., 2005; Vos et al., 2010). A liofilização gera produtos de excelente qualidade, decorrentes da utilização de baixas temperaturas durante o processo e da presença de água somente no estado sólido, o que protege a estrutura primária e a forma do produto, gerando mínimas reduções de volume (Ratti, 2001). Os produtos liofilizados são secos, leves, porosos e de fácil reidratação (Barbosa-Cánovas et al., 2005). Por outro lado, a aplicação da técnica é de alto custo e tempo prolongado, o que prejudica a sua aplicação comercial (Azeredo, 2005; Barbosa-Cánovas et al., 2005; Poshadri e Kuna, 2010; Ratti, 2001).

De acordo com Barbosa-Cánovas et al. (2005) o princípio do método da liofilização está baseado na sublimação da água do produto previamente congelado, e, devido a isso, existem duas características importantes na liofilização: a primeira é que o processo é feito sob altíssimo vácuo ou ausência de ar, prevenindo reações deteriorativas como as de oxidação durante a secagem, e a segunda é que as temperaturas utilizadas estão em torno da temperatura ambiente, e sendo assim, produtos que podem se decompor ou sofrer alterações na estrutura, textura, aparência e características sensoriais por consequência da aplicação de altas temperaturas podem ser secos com mínimas alterações físicas ou químicas. A primeira etapa da liofilização é o congelamento rápido do produto, com a formação de pequenos cristais de gelo, que apesar de necessitar um maior tempo de secagem, resulta em um produto de qualidade superior, e a segunda etapa, é a sublimação do gelo sob vácuo (Barbosa-Cánovas et al., 2005).

Uma das principais diferenças entre as micropartículas produzidas por liofilização das partículas produzidas por atomização é a morfologia. As atomizadas se caracterizam por apresentarem forma esférica e de tamanhos diferentes (Ferrari et al., 2012), entretanto, dentro de uma faixa de tamanho não muito extensa. Por outro lado, as partículas produzidas por liofilização possuem uma estrutura completamente diferente, com formato irregular, semelhante a flocos ou “vidro quebrado” (Ezhilarasi et al., 2013), sendo que os tamanhos variam dentro de uma faixa bastante grande.

Existem diversos estudos avaliando a encapsulação de compostos fenólicos por liofilização. Laine et al. (2008) encapsularam compostos fenólicos de *cloudberry* (*Rubus chamaemorus*) em maltodextrina por liofilização. Os autores diluíram 9% (p/p) de maltodextrina e 1% (p/p) de extrato seco de *cloudberry* em água destilada, e liofilizaram as amostras por 48 horas, observando uma retenção de 79% de elagitaninos, fenol presente em maior quantidade no extrato. Rosa et al. (2013) encapsularam ácido gálico em β -ciclodextrina, quitosana e xantana por liofilização, obtendo 80, 91 e 77,5% de eficiência de encapsulação, respectivamente. Sanchez et al. (2013) encapsularam os polifenóis de vinho de uva Cabernet Sauvignon utilizando maltodextrina (20% em relação ao peso total) através da liofilização por 40 horas (vácuo inferior a 200 μ mHg) e não observaram perdas após o processo. Torres et al. (2010) e Torres et al. (2015) avaliaram o comportamento dos polifenóis de casca de uva frente ao processo de liofilização, entretanto, estudos encapsulando os compostos fenólicos da casca da uva por liofilização não foram encontrados.

3.3 Agentes encapsulantes

Os materiais de revestimento, que são basicamente materiais capazes de formar película, podem ser selecionados a partir de uma grande variedade de polímeros naturais e sintéticos, de acordo com as características desejadas para as microcápsulas (Poshadri e Kuna, 2010). Alguns dos materiais utilizados são proteínas, lipídios e carboidratos, tais como amidos, gomas e celulosas (Umer et al., 2012).

Um material de revestimento ideal para emprego em alimentos deve apresentar as seguintes características (Desai e Park, 2005):

- Boas propriedades reológicas em altas concentrações, como por exemplo, baixa viscosidade, a fim de facilitar a aplicação das técnicas de encapsulação;
- Habilidade de dispersar ou emulsificar o material ativo e estabilizar a emulsão produzida, quando necessário;
- Não reagir com o material a ser encapsulado durante o processo e armazenamento;
- Capacidade de selar e manter o material ativo dentro de sua estrutura durante o processamento e armazenamento;

- Habilidade de liberar completamente o solvente utilizado para o processo de encapsulamento sob condições de secagem ou dessolvatação;
- Capacidade de fornecer máxima proteção ao material ativo contra as condições ambientais (oxigênio, calor, luz, umidade, etc);
- Ser solúvel em solventes que possam ser utilizados na indústria de alimentos (água, etanol, etc);
- Possuir grau alimentício, e preço não muito elevado.

Um dos tipos de materiais de cobertura utilizados para encapsulação de compostos, são as fibras dietéticas, que são considerados os polissacarídeos com grau de polimerização maior que 3, que não são digeridas nem absorvidas no intestino delgado, ou seja, resistem à hidrólise por enzimas alimentares presentes no organismo humano (Phillips, Ogasawarab e Ushida, 2008; Phillips e Williams, 2009). Incluem celulose, hemicelulose, lignina, gomas, celuloses modificadas, mucilagens, oligossacarídeos e pectinas (Phillips, Ogasawarab e Ushida, 2008). As fibras dietéticas têm, geralmente, as seguintes propriedades: reduzir o tempo de trânsito intestinal e aumentar o volume das fezes, ser fermentável pela microbiota do cólon, reduzir os níveis de colesterol total e/ou LDL no sangue e reduzir a glicemia pós-prandial no sangue e/ou os níveis de insulina (Phillips, Ogasawarab e Ushida, 2008). De acordo com Gibson e Roberfroid (1995), fibras alimentares podem ser classificadas como prebióticos se não forem digeridas pelo organismo humano, beneficiando o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de um número limitado de bactérias do cólon, melhorando assim a sua saúde.

3.3.1 Goma arábica

A goma arábica é uma goma, comestível e seca, exsudada dos ramos e caule de *Acacia senegal*, que é rica em fibra solúveis não viscosas, e é constituída principalmente por polissacarídeos de elevada massa molecular e seus sais de cálcio, magnésio e potássio, e quando se hidrolisa forma L-arabinose, D-galactose, L-ramnose e ácido D-glucurônico (Phillips e Williams, 2009).

A goma arábica pode ser classificada como um carboidrato não digerível, ou seja, uma fibra dietética, visto que ela pode chegar ao intestino grosso sem ter sofrido digestão no intestino delgado, onde é fermentada por bactérias intestinais,

formando ácidos graxos de cadeia curta (Adiotomre et al.,1990; Annison et al.,1995; Kishiimoto et al., 2006). Estudos indicam que a goma arábica é uma fibra dietética bifidogênica (Michel et al.,1998), pois é capaz de aumentar seletivamente a proporção de bactérias ácido-lácticas e bifidobactérias, e, além disso, aumenta o teor de água nas fezes, o que proporciona uma melhora na saída (Glover et al., 2009).

Dentre os benefícios à saúde com os quais a goma arábica está relacionada estão: efeitos tróficos na mucosa intestinal, redução da diarreia, aumento no conteúdo de umidade e conseqüentemente do peso das fezes, efeito hipocolesterolêmico e hipoglicêmico, benefícios no tratamento de doenças renais, como redução da pressão arterial (Glover et al., 2009; Phillips, Ogasawarab e Ushida, 2008).

A goma arábica possui importantes características, como alta solubilidade em água, baixa viscosidade mesmo em altas concentrações e propriedades emulsificantes (Cho e Dreher, 2001; Phillips e Williams, 2000). Devido a estas propriedades, a goma arábica é a goma mais utilizada na encapsulação de materiais (Mahfoudhi e Hamdi, 2014), e muito utilizada na encapsulação de compostos antioxidantes como os de origem fenólica. Idham, Muhamad e Sarmidi (2012) observaram que a goma arábica teve alta eficiência (98,4%) na encapsulação de antocianina de *Hibiscus sabdariffa* L. por atomização. Tonon, Brabet e Hubinger (2010) encapsularam suco de açaí com diferentes materiais de parede, e dentre estes, goma arábica, por atomização, e observaram que não houve diferença significativa para o teor de antocianinas totais e o potencial antioxidante entre o suco e do suco microencapsulado. Outros pesquisadores observaram a eficiência da goma arábica misturada há outros agentes encapsulantes como maltodextrina (Burin et al., 2011; Luca et al., 2013; Silva et al., 2013).

3.3.2 Ciclodextrinas

A ciclodextrina é um oligossacarídeo cíclico, derivado do amido podendo ser constituído por 6 unidades de glicopirranose (α -ciclodextrina), 7 unidades de glicopirranose (β -ciclodextrina), 8 unidades de glicopirranose (γ -ciclodextrina) ou mais, ligadas por ligações α -(1,4) (Figura 12) (Szejtli, 1998; Valle, 2004). São preparadas a partir de amido parcialmente hidrolisado (maltodextrina), através de um processo enzimático (Szejtli, 1998; Desai e Park, 2008). A parte externa da molécula de

ciclodextrina é hidrofílica, enquanto que a parte interna é hidrofóbica (Szejtli, 1998), formando uma cavidade que pode possuir tamanho variável, de acordo com o número de unidades de glicose da molécula de ciclodextrina (Bilensoy e Hincal, 2009; Harada, Takashima e Yamaguchi, 2009). A inclusão molecular é uma técnica em nível molecular, onde se utiliza moléculas como as ciclodextrinas para encapsular compostos de interesse (Desai e Park, 2008; Poshadri e Kuna, 2010), que é seguida de alguma técnica de secagem, como, por exemplo, a atomização.

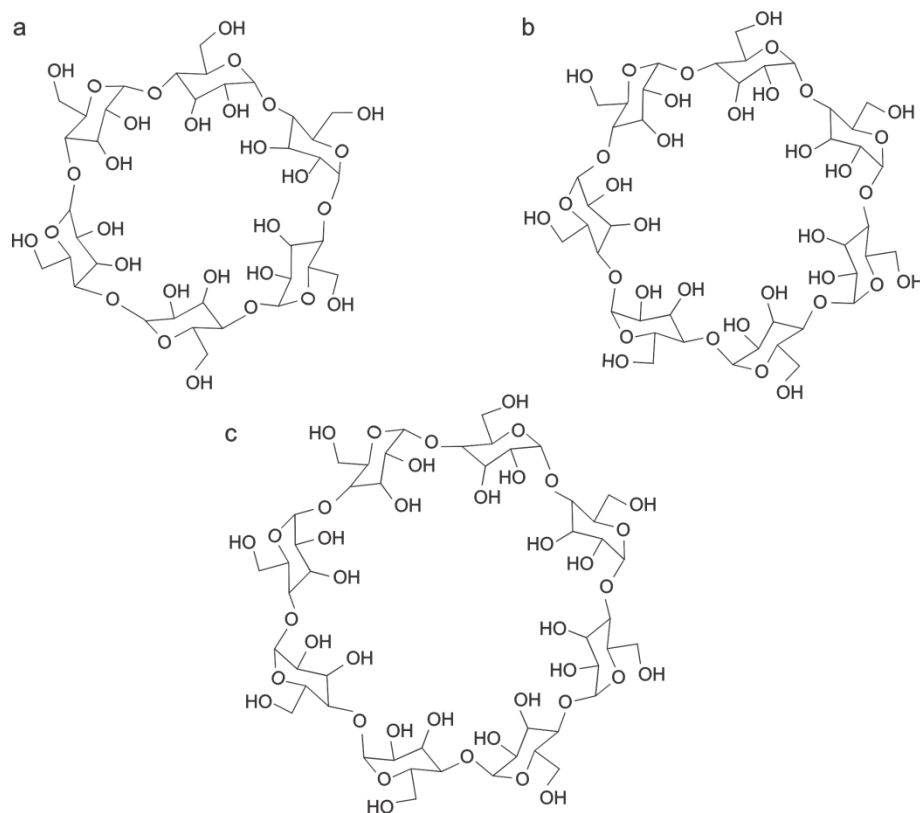


Figura 12. Estrutura química da (a) α -ciclodextrina, (b) β -ciclodextrina e (c) γ -ciclodextrina.

Fonte: Davis e Brewster (2004).

Em solução aquosa, a cavidade interna, ligeiramente apolar, é ocupada por moléculas de água, em uma interação não favorecida (polar-apolar), e, portanto, as moléculas de água podem ser facilmente substituídas por moléculas mais apropriadas, menos polares do que a água, resultando assim na formação de um complexo de inclusão (Szejtli, 1998). A eficácia da complexação das ciclodextrinas é

afetada pelo tamanho, grupos funcionais e hidrofobicidade do material que será encapsulado, e pelo tamanho da cavidade interna da ciclodextrina que está sendo utilizada (Fang e Bandhari, 2010; Mercader-Ros et al., 2010; Valle, 2004).

Dentre as ciclodextrinas, a β -ciclodextrina é a mais utilizada, devido a sua alta eficiência de encapsulação, adequada dimensão da cavidade e baixo custo (Sancho et al., 2011; Valle, 2004). Entretanto, sua solubilidade em água é muito baixa, o que ocasionou o desenvolvimento de ciclodextrinas modificadas com melhores propriedades de solubilidade. A hidroxipropil- β -ciclodextrina (Figura 13) é um composto derivado, produzido através da modificação da β -ciclodextrina, que possui boa capacidade de inclusão, maior solubilidade em água além de ser, assim como a β -ciclodextrina, não tóxica (Gould e Scott, 2005; Stella e He, 2008; Uekama, Hirayama e Irie, 1998).

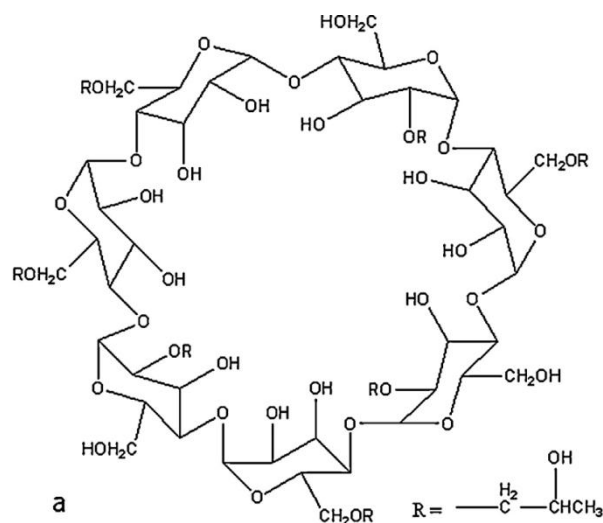


Figura 13. Estrutura química da hidroxipropil- β -ciclodextrina.

Fonte: Miletic et al. (2013).

A encapsulação em ciclodextrinas causa diversos efeitos nas propriedades das moléculas encapsuladas, como aumento da solubilidade, da estabilidade oxidativa, estabilização de emulsões, controle da volatilidade, modificação de gosto, sabor ou odor desagradável e da liberação controlada de sabores (Valle, 2004). As CDs possuem outra característica importante, de não serem absorvidas no trato gastrointestinal superior, chegando intactas ao cólon, sendo lá completamente metabolizadas pela microbiota presente (Szente e Szejtli, 2004).

As ciclodextrinas podem ser utilizadas na encapsulação de compostos fenólicos isolados (Lucas-Abellán et al., 2008; Mercader-Ros et al., 2010; Pralhad e Rajendrakumar, 2004; Rosa et al., 2013; Sansone et al., 2011; Wang et al., 2011) e de extratos fenólicos de plantas e frutas (Haidong et al., 2011; Kalogeropoulos et al., 2010; Mantegna et al., 2012; Rosa et al., 2014).

3.3.3 Goma guar parcialmente hidrolisada

Galactomananas são carboidratos macromoleculares encontrados em várias sementes albuminoides ou endospermicas (Phillips e Williams, 2009). A goma guar é um polissacarídeo solúvel em água, encontrada nas sementes de guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L.), que é uma planta originária da Índia e Paquistão (Cho e Dreher, 2001). A goma guar é utilizada na indústria de alimentos como agente espessante e como estabilizante e tem, também, efeitos positivos sobre a saúde, como a redução do colesterol e dos níveis de açúcar no sangue.

Entretanto, a goma guar é extremamente viscosa, dificultando a sua utilização como aditivo alimentar, além de inviabilizar seu potencial benéfico à saúde, visto que ela deve ser adicionada em pequenas quantidades (Parisi et al., 2005). Dessa forma, a hidrólise da goma guar origina uma goma com viscosidade reduzida, podendo ser facilmente adicionada nos alimentos em quantidades superiores à goma guar (Fernandes et al., 2006). A goma guar parcialmente hidrolisada (GGPH) possui uma cadeia principal constituída por manose e galactose na proporção de 2:1 (Figura 14) (Kuo, Hsu e Chien, 2009; Santas et al., 2012; Yoon, Chu e Juneja, 2008).

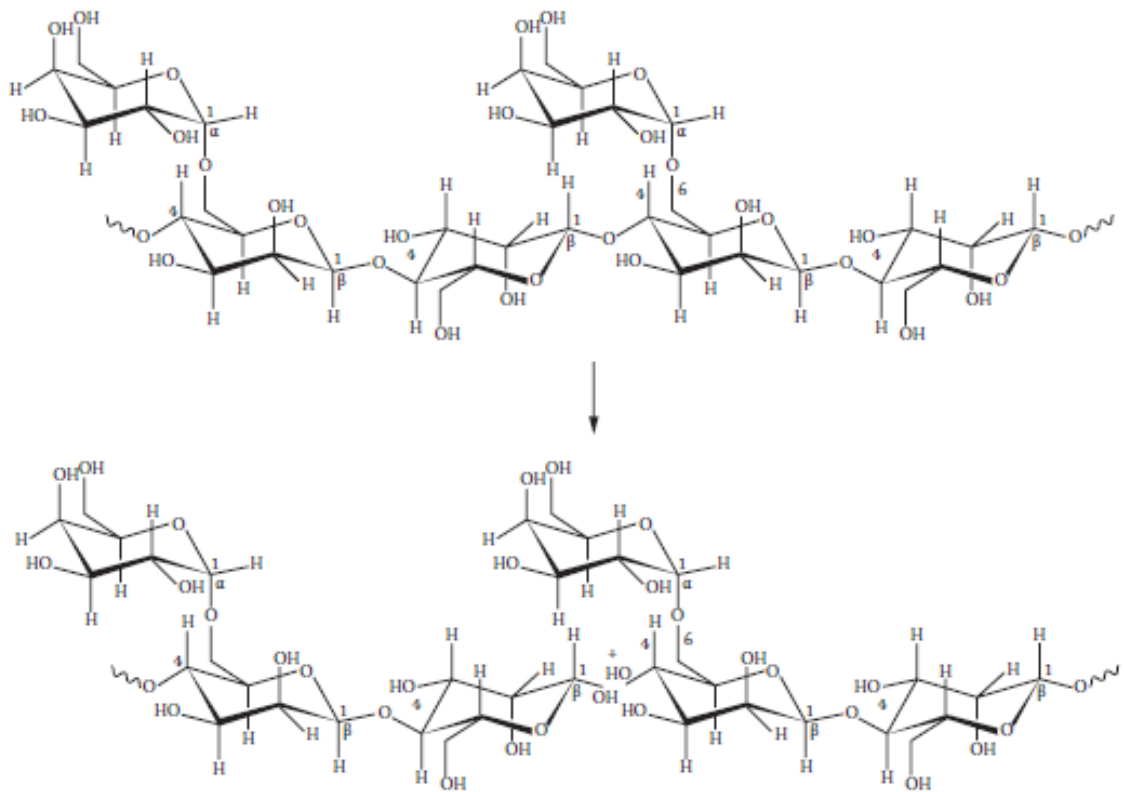


Figura 14. Estrutura química da goma guar intacta e da goma guar parcialmente hidrolisada.

Fonte: Kapoor e Juneja (2009).

A GGPH possui diversos efeitos benéficos ao organismo humano. Reduz a diarreia e constipação (Alam et al., 2005; Belo, Diniz e Pereira, 2008; Takahashi et al., 1993; Takahashi et al., 1994; Ustundag et al., 2010), melhora os sintomas da síndrome do intestino irritável (Parisi et al., 2005), melhora o metabolismo de lipídios (Ide et al., 1991), reduz os níveis de colesterol e de glicose no sangue (Tsuda et al., 1998). Por ser uma fibra dietética (Yoon, Chu e Juneja, 2008), a GGPH não é digerida no sistema gastrointestinal superior, chegando intacta ao cólon, onde é fermentada pela microbiota presente, formando principalmente ácidos graxos de cadeia curta, como acetato, propionato e butirato. Estudos *in vitro* demonstram que a GGPH melhora moderadamente o crescimento de diversas cepas de bactérias (Okubo et al., 1994), e fezes frescas inoculadas com GGPH resultam em produção destes ácidos graxos (Velázquez et al., 2000). A GGPH vem sendo muito utilizada como suplemento alimentar juntamente com outras fibras, entretanto, a GGPH ainda

é pouco usada para encapsulamento, e ainda não existem estudos publicados que relatem a encapsulação de compostos de origem fenólica com este composto.

3.3.4 Polidextrose

A polidextrose (Figura 15) é um polímero de glicose, solúvel em água, produzido por condensação a vácuo da glicose na presença de sorbitol e quantidades catalíticas de ácido cítrico ou fosfórico, que resulta em um polímero ligado aleatoriamente (Burdock e Flamm, 1999; Flood, Auerbach e Craig, 2004). Todas as possíveis ligações glicosídicas com o carbono anomérico da glicose estão presentes: α e β 1-2, 1-3, 1-4 e 1-6, sendo que as ligações 1-6 ligações predominam, e o grau médio de polimerização da molécula é de 10 a 12, com massa molecular média de 2000 (Flood, Auerbach e Craig, 2004; Ribeiro et al., 2003).

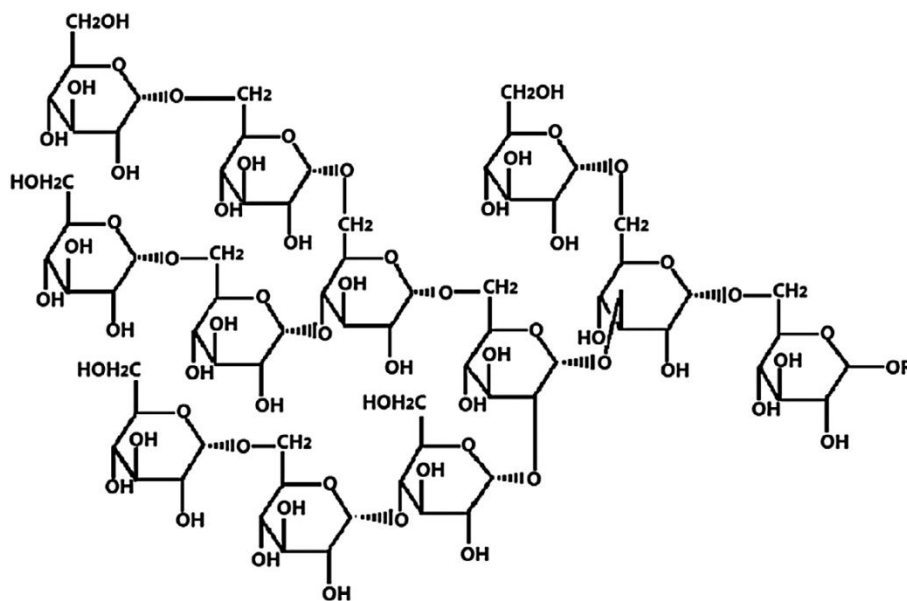


Figura 15. Estrutura química da polidextrose (Grupo R = H, sorbitol, ou mais moléculas de polidextrose).

Fonte: Wang, Shi e Le (2014).

Além de solúvel em água, a polidextrose possui baixa viscosidade em solução (Raninem et al., 2011), características importantes para um bom agente encapsulante. Possui também baixo valor calórico, e é um agente de volume utilizado para proporcionar corpo e textura à alimentos de baixo teor calórico (Ribeiro

et al., 2003). O baixo valor calórico da polidextrose é resultado da sua baixa digestibilidade no intestino delgado e fermentação incompleta no intestino grosso, propriedades que fazem com que ela seja aceita em inúmeros países como uma fibra dietética (Craig et al., 1999; Flood, Auerbach e Craig, 2004; Wang, Shi e Le, 2014). De acordo com Figdor e Rennhard (1981) cerca de 60% da polidextrose ingerida é expelida nas fezes. Estudos mostram que a polidextrose tem efeitos prebióticos, como redução do pH fecal, aumento na concentração residual de ácidos graxos de cadeias curtas, aumento do número de bifidobactérias nas fezes, redução da microflora putrefativa e supressão da produção de metabólitos cancerígenos (Endo et al., 1991; Jie et al., 2000; Probert et al., 2004). A polidextrose já foi utilizada para encapsulação de microrganismos (Okuro et al., 2013; Pinto et al., 2015), entretanto, não há relatos da utilização da mesma na encapsulação de compostos fenólicos.

CAPÍTULO 2

Aplicação de goma arábica, β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina na obtenção de micropartículas de extrato fenólico de casca de uva (*Vitis labrusca* L.) Isabel

Luiza Siede Kuck^{a,*}, Caciano Pelayo Zapata Noreña^a

^aLaboratório de Engenharia de Processos em Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43.212, Campus do Vale, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43.212, Campus do Vale, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil Tel.: +55 051 3308 7791; fax: +55 051 3308 7048.

E-mail address: luizakuck@yahoo.com.br (L. S. Kuck).

Artigo a ser traduzido e submetido para publicação na revista Carbohydrate
Polymers.

Resumo

Com objetivo de aumentar a estabilidade dos compostos fenólicos de uva Isabel, foram utilizadas goma arábica, β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina em diferentes proporções, totalizando 5%, para obter micropartículas de polifenóis, obtidos por extração em solução ácida da casca da uva. O efeito da concentração dos agentes encapsulantes na formação das micropartículas foi estudado através do teor de fenóis, antocianinas monoméricas, flavonoides e flavanols totais, atividade antioxidante (DPPH, CUPRAC e HRSA), cor, umidade, atividade de água (A_w), solubilidade, higroscopicidade e temperatura de transição vítrea (T_g). As micropartículas preparadas com 5% de GA e as com 3% de GA e 2% de β -CD foram as que obtiveram maior retenção de fenóis (78,9% e 67,5% respectivamente), antocianinas monoméricas (35,3 e 29,9% respectivamente) e maior atividade antioxidante, com retenções superiores a 50% para os métodos de DPPH e CUPRAC. Foi identificado que o tratamento elaborado com 3% de GA e 2% de β -CD foi o que apresentou maior retenção de flavonoides (67,2%) e flavanols totais (51,1%), além de propriedades físicas adequadas para este tipo de produto, como A_w de 0,175, solubilidade superior a 90%, higroscopicidade de 17,3% e T_g de 32,8 °C, o que pode contribuir para uma maior estabilidade do produto durante o armazenamento.

Palavras-chave: atomização, fenóis totais, antocianinas monoméricas totais, atividade antioxidante.

1 Introdução

A uva (*Vitis* sp.) é uma das frutas mais cultivadas e consumidas no mundo, tanto *in natura* quanto processada, sendo os maiores produtores e consumidores os Estados Unidos da América, o Brasil e a Espanha (FAOSTAT, 2012; Xu, Zhang, Cao & Lu, 2010). Variedades americanas de *Vitis labrusca* L., são amplamente cultivadas no Brasil, representando mais de 80% da quantidade de uva utilizada para processamento de sucos e outros produtos, sendo as cultivares mais comuns a Isabel, Bordo e Concord (Nixdorf & Hermosín-Gutiérrez, 2010; Toaldo et al., 2013).

Diversos tipos de polifenóis podem ser encontrados na casca da uva, dentre os quais estão as antocianinas, ácidos fenólicos e estilbenos como o resveratrol (Garrido & Borges, 2011; Pinelo, Arnous & Meyer, 2006). Estes compostos possuem

atividade antioxidante, que está ligada a efeitos benéficos à saúde, como capacidade cardioprotetora, anti-câncer, anti-diabetes, antimicrobiana, anti-inflamatória, retardo doenças neurodegenerativas, doenças nos rins e envelhecimento precoce (Rodrigo, Miranda & Vergara, 2011).

Entretanto, os polifenóis são instáveis frente a diversos fatores que estão presentes no processamento e armazenamento dos alimentos, tais como enzimas oxidativas, aplicação de altas temperaturas, congelamento, pH, umidade, presença de luz, oxigênio, metais e íons (Bakowska, Kucharska & Oszmianski, 2003; Fang & Bhandari, 2011). A microencapsulação é uma técnica utilizada para proteger compostos sensíveis das condições adversas do meio, aumentando a sua estabilidade (Bakowska-Barczak & Kolodziejczyk, 2011; Su et al., 2008).

Diversos materiais de parede podem ser utilizados como encapsulantes de alimentos. O encapsulante ideal deve possuir capacidade de formar filme, propriedades emulsificantes, ser biodegradável, resistente ao trato gastrointestinal, ter baixa viscosidade e alto conteúdo de sólidos, possuir baixa higroscopicidade e baixo custo (Silva, Stringheta, Teófilo & Oliveira, 2013). Entretanto, dificilmente um agente encapsulante vai possuir todas estas características, dessa forma, o uso de combinações de agentes encapsulantes se torna uma alternativa para aumentar a eficiência da encapsulação.

A goma arábica (GA) é um dos agentes encapsulantes mais utilizados para atomização de sucos e extratos de frutas, principalmente devido a sua alta solubilidade em água e baixa viscosidade (Cano-Chauca, Stringheta, Ramos & Cal-Vidal, 2005; Shahidi & Han, 1993; Tonon, Brabet & Hubinger, 2010) e é aplicada sozinha (Nadeem, Torun & Özdemir, 2011; Tonon et al., 2010) ou combinada com outros encapsulantes (Burin, Rossa, Ferreira-Lima, Hillmann & Boirdignon-Luiz 2011; Fernandes, Borges & Botrel, 2014; Khazaei, Jafari, Ghorbani & Kakhki, 2014). Além disso, a goma arábica possui propriedades de fibra solúvel, alta tolerância digestiva, baixo valor calórico e é uma substância prebiótica (Adiotomre, Eastwood, Edwards & Brydon, 1990; Ali, Ziada & Blunden, 2009; Cherbut, Michel, Raison & Severine, 2003; Kishimoto, Ushida, Phillips, Ogasawara & Sasaki, 2006).

As ciclodextrinas (CDs) são oligômeros cíclicos (Davis & Brewster, 2004) que podem formar complexos de inclusão com diversos compostos orgânicos (Szejtli, 1998), dependendo do tamanho relativo da cavidade interna da CD em relação ao tamanho da molécula hospedeira ou presença de certos grupos funcionais

(Mercader-Ros, Lucas-Abellán, Fortea, Gabaldón & Núñez-Delicado, 2010; Valle, 2004). Dentre as CDs, a β -CD é a mais utilizada, devido a sua alta eficiência de encapsulação, adequada dimensão da cavidade e baixo custo (Sancho, Gasull, Blanco & Castro, 2011; Valle, 2004). A hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) é um composto derivado, produzido através da modificação da β -CD, que possui boa capacidade de inclusão, maior solubilidade em água além de ser, assim como a β -CD não tóxica (Gould & Scott, 2005; Stella & He, 2008; Uekama, Hirayama & Irie, 1998). As CDs possuem outra característica importante, de não serem absorvidas no trato gastrointestinal superior, chegando dessa forma intacta ao cólon, sendo então completamente metabolizadas pela microbiota presente (Szente & Szejtli, 2004). As CDs são muito utilizadas na encapsulação de compostos fenólicos isolados (Lucas-Abellán, Fortea, Gabaldón & Núñez-Delicado, 2008; Mercader-Ros et al., 2010; Pralhad & Rajendrakumar, 2004; Rosa et al., 2013; Sansone et al., 2011; Wang, Cao, Sun & Wang, 2011) e de extratos fenólicos de plantas e frutas (Haidong, Fang, Zhihong & Changle, 2011; Kalogeropoulos, Yannakopoulou, Gioxari, Chiou & Makris, 2010; Mantegna et al., 2012; Rosa et al., 2014).

Assim, o objetivo deste trabalho foi elaborar micropartículas a partir do extrato aquoso fenólico da casca da uva tinta cv. Isabel, utilizando diferentes misturas dos carboidratos goma arábica, β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina, além de caracterizar as micropartículas produzidas.

2 Materiais e métodos

2.1 Material

As uvas (*V. labrusca*) da variedade Isabel foram obtidas no Centro de Abastecimento do Rio Grande do Sul, localizado em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, na safra de 2012/2103. As bagas foram removidas do engaço, lavadas com água, embaladas em sacos de polietileno e congeladas $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da utilização. Os agentes encapsulantes utilizados foram: Goma Arábica (Instantgum BA, Nexira Brasil Comercial Ltda), β -ciclodextrina (Cavamax® W7 Pharma, Wacker) e Hidroxi-propil- β -ciclodextrina (Kleptose HPB Oral Grade, Roquette). DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico), DMACA (*p*-dimetilaminocinamaldeído), neocuproína, catequina e ácido gálico foram obtidos da Sigma (Sigma-Aldrich). Os demais reagentes utilizados foram reagentes de grau analítico

2.2 Preparo do extrato

As uvas foram submetidas ao processo de branqueamento a 80 °C, por 5 minutos (Forteza, López-Miranda, Serrano-Martínez, Carreño & Núñez-Delicado, 2009), e após foram resfriadas em banho de gelo por 3 minutos. Após separação manual da casca, foi realizada a obtenção de extratos contendo os compostos fenólicos, empregando água acidificada com ácido cítrico a 2% (m/v). As cascas foram misturadas à água acidificada na proporção de 1:3, e esta mistura foi então triturada e mantida em ambiente escuro por 20 horas a temperatura ambiente. Após este período, o extrato foi filtrado em papel filtro Whatman nº01, para a separação dos resíduos sólidos.

2.3 Elaboração das micropartículas

Aos extratos foram adicionados 5% (m/v) de material de parede, nas seguintes combinações: GA – 5% de goma arábica; GA/ β -CD1 - 4% de goma arábica e 1% de β -ciclodextrina; GA/ β -CD2 – 3% de goma arábica e 2% de β -ciclodextrina; GA/HP- β -CD1 – 4% de goma arábica e 1% de Hidroxipropil- β -ciclodextrina; e GA/HP- β -CD2 - 3% de goma arábica e 2% de Hidroxipropil- β -ciclodextrina.

As dispersões foram obtidas adicionando os encapsulantes nas combinações mencionadas anteriormente, e dissolvidas no extrato com auxílio de Ultra-Turrax (T25, Ika), a 5000 rpm por 3 minutos. Logo após, a dispersão foi agitada a 500 rpm por uma hora em agitador mecânico (RW20, Ika) para induzir a inclusão molecular. A adição da goma arábica em cada tratamento foi feita em agitador mecânico, a 500 rpm até completa dissolução.

A secagem por atomização foi realizada em atomizador de duplo fluido, do tipo pneumático (Mini-Spray-Dryer LM MSDi 1.0, LABMAQ), com bico de alimentação de 1,0 mm de diâmetro. A alimentação do secador foi realizada através de uma bomba peristáltica com vazão de 0,60 L/h, a temperatura do ar de secagem de foi de 160 °C, a pressão de ar comprimido 3,5 Kgf/cm² e a vazão de ar de atomização 40,5 L/h. Após o término do processo as amostras foram imediatamente armazenadas em sacos de polietileno selados, cobertos por papel alumínio em dessecador, até o momento da realização das análises, que foram feitas em triplicata e em ausência de luz.

Não foi possível atomizar o extrato sem a adição de agentes encapsulantes, pois devido à alta viscosidade e higroscopicidade do pó resultante, devido a presença de açúcares e ácidos no extrato de casca de uva, o mesmo fica aderido às paredes do atomizador.

2.4 Caracterização do extrato e das micropartículas

2.4.1 Determinação de fenóis totais (TP), antocianinas monoméricas totais (TMA), flavonoides totais (TFO) e flavanols totais (TFA)

Os fenóis totais foram determinados utilizando o método colorimétrico Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). As leituras foram feitas em espectrofotômetro (Genesys S10, Thermo Scientific) a 765 nm e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por 100 g em base seca.

As antocianinas monoméricas totais foram determinadas conforme metodologia de Lee, Durst & Wrolstad (2005). As leituras das absorvâncias foram feitas em espectrofotômetro a 520 e 700 nm. Os resultados foram expressos em mg de malvidina-3,5-diglicosídeo (absortividade molar 37000 L/cm/mol e massa molar 724,5 g/mol) por 100 g de amostra em base seca.

Os flavonoides totais foram determinados utilizando-se metodologia Zhishen, Mengcheng & Jianming (1999) adaptada por Yang, Meyers, Van der Heide & Liu (2004). As leituras das absorvâncias foram feitas em espectrofotômetro a 510 nm. O conteúdo de flavonoides totais foi expresso em mg de catequina por 100 g em base seca.

Os flavanols totais foram determinados utilizando o método do DMACA (Arnous, Makris & Kefalas, 2001), com algumas modificações. 0,2 mL da amostra diluída foi colocada em um eppendorf contendo 1 mL de solução metanólica (HCl-MeOH 1N) de DMACA 0,1% (m/v). As amostras foram agitadas em *vórtex* e deixadas em repouso por 10 minutos, e posteriormente foram centrifugadas a 10000 rpm, por 5 minutos. A leitura das absorvâncias foi feita em espectrofotômetro a 640 nm. Os resultados foram expressos em mg de catequina por 100 g de amostra em base seca.

2.4.2 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante das micropartículas foi determinada pelos métodos do radical DPPH, de capacidade antioxidante de redução do cobre (CUPRAC) e da capacidade de eliminação do radical hidroxil (HRSA).

Para a determinação da atividade antioxidante por DPPH (Brand-Williams, Cuvelier & Berset, 1995) o extrato e os pós foram diluídos em água. 0,1 mL das amostras diluídas foram misturadas a 3,9 mL de solução metanólica de DPPH 60 μ M. A absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro, a 515 nm, após 3 horas, que é o tempo que a reação leva para atingir o seu platô, determinado previamente. Uma curva padrão de Trolox foi construída, e os resultados foram expressos em μ mol de Trolox equivalente (TE) por 100 g de amostra em base seca.

A atividade antioxidante pelo método CUPRAC foi feita de acordo com Apak, Güçlü, Özyürek & Karademir (2004). As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 450 nm, 60 minutos após a mistura dos reagentes. Foi construída uma curva padrão de Trolox, e os resultados foram expressos em μ mol de Trolox equivalente (TE) por 100 g de amostra em base seca.

A atividade antioxidante pelo método HRSA foi feita de acordo com Meng, Fang, Qin, Zhuang & Zhang (2012). A leitura das absorbâncias foi feita em espectrofotômetro a 593 nm. O resultado foi expresso em % de radicais sequestrados.

2.4.3 Medição de cor

A cor foi medida utilizando um colorímetro (CR400/410, Minolta), de acordo com o sistema CIE $L^*a^*b^*$, onde L^* indica a luminosidade (0 = preto e 100 = branco), e a^* e b^* , as coordenadas de cromaticidade indicam tonalidade da coloração para verde ($-a^*$)/vermelho($+a^*$) e azul ($-b^*$)/amarelo($+b^*$) (Bakker, Bridle & Timberlake, 1986). O instrumento foi calibrado utilizando placa de cerâmica branca ($L^*= 97,47$; $a^*= 0,08$; $b^*= 1,76$). A partir de a^* e b^* , foram calculados os valores do ângulo Hue ($H^* = \tan^{-1} b^*/a^*$), que indica a cor da amostra (0° ou 360° = vermelho, 90° = amarelo, 180° = verde e 270° = azul) e do Croma ($C^* = [a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$), que indica pureza ou saturação da amostra (valores altos significam coloração mais vívida ou pura) (Bakker et al., 1986; Hernández-Herrero & Frutos, 2014).

2.4.4 Determinação das propriedades físicas das micropartículas

A umidade das amostras foi calculada através da perda de massa após o aquecimento da amostra a 105 °C de acordo com método nº 984.25 da AOAC (1990).

A atividade de água (A_w) foi medida através de leitura direta em medidor eletrônico (Aqualab 3TE-Decagon) seguindo o método nº 978.18 (AOAC,1990).

A solubilidade dos pós foi determinada de acordo com Cano-Chauca et al. (2005), com algumas modificações. 1 g de amostra foi misturado a 100 mL de água destilada e submetida à agitação em agitador magnético por 5 minutos. A seguir, a solução foi centrifugada a 3000xg durante 15 minutos e uma alíquota de 25 mL do sobrenadante foi transferido para um béquer de 50 mL e seco em estufa a 105 °C até peso constante. A solubilidade foi calculada pela diferença de massa.

A higroscopicidade dos pós foi determinada de acordo com Cai & Corke (2000) e Tonon, Brabet & Hubinger (2008). 1 g de amostra foi pesada em béquer de vidro e colocada em um recipiente hermético contendo solução saturada de cloreto de sódio (75% de umidade relativa). Os recipientes contendo as amostras foram armazenados em incubadora (411/FDP, Ethik Technology), a 25 °C. As amostras foram pesadas após uma semana de armazenamento, e depois a cada 24 horas, até que o equilíbrio fosse atingido. A higroscopicidade (HG) foi expressa em percentual utilizando a equação $HG(\%) = (\Delta m / (M + M_i)) / (1 + \Delta m / M)$, onde Δm (g) é o aumento de peso do pó depois de atingir o equilíbrio, M é a massa inicial do pó e M_i é o conteúdo de água livre no pó antes da medição (Jaya & Das, 2004).

A temperatura de transição vítrea (T_g) das micropartículas foi determinada por calorimetria exploratória diferencial (DSC) (DSC Q20, TA Instruments). Aproximadamente 8 mg de amostra foram colocadas em recipientes herméticos de alumínio (Tzero, TA Instruments). Um recipiente vazio foi utilizado como referência. O gás de purga utilizado foi utilizado nitrogênio ultra-puro (vazão 50 mL/min). A variação de temperatura foi de -80 °C a 120 °C a uma taxa de aquecimento de 40 °C/min. Os valores de temperatura de transição vítrea das amostras foram calculados utilizando o software TA Universal Analysis 5.5.3.

2.4.5 Microscopia eletrônica de varredura

As estruturas das partículas elaboradas foram avaliadas por microscópio eletrônico de varredura (JSM 6060, JEOL Ltda). Para a visualização, as amostras

foram fixadas em *stubs* utilizando fita adesiva dupla face de carbono. A superfície das amostras foi metalizada utilizando ouro, e após examinadas no microscópio, operando a uma tensão de 8 kV e empregando uma ampliação de x300.

2.4.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos às análises estatísticas de ANOVA e os tratamentos às provas de comparações múltiplas de médias de Tukey, utilizando o programa SAS 9.3.

3 Resultados e discussão

3.1 Determinação de fenóis totais (TP), antocianinas monoméricas totais (TMA), flavonoides totais (TFO) e flavanols totais (TFA)

A Tabela 1 mostra os teores dos compostos bioativos determinados no extrato aquoso de casca de uva e nas micropartículas.

Tabela 1: Teor de fenóis, antocianinas monoméricas, flavonoides e flavanols do extrato aquoso da casca da uva Isabel e das micropartículas elaboradas com diferentes materiais de parede.

	Fenóis*	Antocianinas**	Flavonoides***	Flavanols***
Extrato	971,85±16,37 ^A	338,27±2,06 ^A	285,10±3,81 ^A	76,26±2,54 ^A
GA	766,93±1,72 ^B	108,87±1,19 ^B	156,58±5,96 ^B	25,80±0,27 ^B
GA/β-CD1	518,70±3,43 ^C	82,24±0,78 ^C	174,92±3,71 ^C	19,20±0,33 ^C
GA/β-CD2	655,56±2,63 ^D	91,33±1,59 ^D	191,57±2,98 ^D	38,96±0,79 ^D
GA/HP-β-CD1	584,17±2,95 ^E	63,60±1,39 ^E	171,14±1,91 ^{B,C}	31,11±0,16 ^E
GA/HP-β-CD2	626,83±6,07 ^F	90,23±0,78 ^D	159,07±2,88 ^B	25,99±0,09 ^B

Diferentes letras em uma mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). GA – 5% de goma arábica; GA/β-CD1 - 4% de goma arábica e 1% de β-ciclodextrina; GA/β-CD2 – 3% de goma arábica e 2% de β-ciclodextrina; GA/HP-β-CD1 – 4% de goma arábica e 1% de Hidroxipropil-β-ciclodextrina; e GA/HP-β-CD2 - 3% de goma arábica e 2% de Hidroxipropil-β-ciclodextrina. Resultados expressos em *mg de ácido gálico/100 g de amostra em base seca, **mg de malvidina-3,5-diglicosídeo/100 g de amostra em base seca, ***mg de catequina/100 g de amostra em base seca.

Quanto ao conteúdo de fenóis totais, as maiores retenções foram obtidas quando utilizado 5% de goma arábica (retenção de 78,9%) e 3% de goma arábica com 2% de β-CD (67,5%). As antocianinas monoméricas totais tiveram melhor percentual de retenção nos mesmos tratamentos, 35,3% quando utilizado 5% de goma arábica e 29,9% quando utilizado 3% de goma arábica com 2% de β-CD. Por

outro lado, para tratamento com 3% de goma arábica com 2% de β -CD, observou-se maior retenção de flavonoides (67,2%) e flavanols totais (51,1%).

Os polifenóis podem sofrer degradação quando expostos ao oxigênio e altas temperaturas, durante o processo de atomização, devido ao favorecimento de reações oxidativas e a perda de compostos voláteis (Georgetti, Casagrande, Souza, Oliveira & Fonseca, 2008; Hamama & Nawar, 1991). A principal função do agente encapsulante é a proteção dos compostos de interesse dos possíveis agentes degradantes. A goma arábica é um excelente agente encapsulante, principalmente por possuir boa solubilidade em água e por seu poder emulsificante (Cano-Chauca et al., 2005; Shahidi & Han, 1993; Tonon et al., 2010). O uso de goma arábica isolada na proporção de 5% demonstrou ser o melhor tratamento na retenção de fenóis totais e antocianinas. As CDs, por sua vez, possuem boa eficiência de encapsulação para compostos aromáticos e heterocíclicos de tamanho limitado, ou seja, de massa molar de 200-800 g/mol (Waleczek, Marques, Hempel & Schmidt, 2003). De acordo com Ratnasooriya & Rupasinghe (2012), a massa molar dos flavanols, flavonols, ácidos fenólicos e estilbenos estão entre 290-458, 302-464, 194-354 e 228-390 g/mol respectivamente, e sendo assim, a cavidade hidrofóbica das moléculas de CD possivelmente encapsulam compostos fenólicos destas classes, o que foi observado através da melhor retenção de flavonoides e flavanols quando utilizado tratamento com 2% de β -CD. Por outro lado, alguns polifenóis de cadeias maiores podem não ter sido bem encapsulados pelas moléculas de ciclodextrina.

De acordo com Ratnasooriya & Rupasinghe (2012), não é recomendado o uso de um percentual maior que 2,5% de β -CD diluída em água, devido a sua baixa capacidade de solubilização. Uma alternativa que poderia ser estudada seria o uso da HP- β -CD, que é mais solúvel que a β -CD, em um percentual maior que 2% ou o aumento do percentual de goma arábica, aumentando assim o percentual total de agente encapsulante.

3.2 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante, analisada por diferentes métodos, tem diferentes características e mecanismos de ação, e não há um ensaio universal, que estime com precisão toda atividade antioxidante de um sistema complexo, sendo assim necessário utilizar pelo menos dois métodos complementares para avaliar a

capacidade antioxidante *in vitro* de uma amostra (Meng et al., 2012). A atividade antioxidante das micropartículas pode ser vista na Tabela 2.

Tabela 2: Atividade antioxidante do extrato aquoso de casca de uva Isabel e das micropartículas elaboradas com diferentes materiais de parede, pelos métodos DPPH, CUPRAC e HRSA.

	DPPH ($\mu\text{mol TE}/100\text{g}$)*	CUPRAC ($\mu\text{mol TE}/100\text{g}$)*	HRSA (%)
Extrato	3896,98 \pm 44,34 ^A	8536,47 \pm 104,33 ^A	81,30 \pm 1,35
GA	2162,85 \pm 77,80 ^B	5052,68 \pm 120,02 ^B	75,64 \pm 1,15 ^A
GA/β-CD1	1610,46 \pm 33,38 ^C	3793,60 \pm 56,40 ^C	86,97 \pm 0,45 ^B
GA/β-CD2	2141,88 \pm 35,45 ^B	5015,86 \pm 104,18 ^B	83,49 \pm 0,42 ^C
GA/HP-β-CD1	1787,46 \pm 50,71 ^{B,C}	4480,08 \pm 62,67 ^D	91,46 \pm 0,27 ^D
GA/HP-β-CD2	1956,06 \pm 61,61 ^{B,C}	4795,42 \pm 174,37 ^E	89,37 \pm 0,57 ^E

Diferentes letras em uma mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). GA – 5% de goma arábica; GA/ β -CD1 - 4% de goma arábica e 1% de β -ciclodextrina; GA/ β -CD2 – 3% de goma arábica e 2% de β -ciclodextrina; GA/HP- β -CD1 – 4% de goma arábica e 1% de Hidroxipropil- β -ciclodextrina; e GA/HP- β -CD2 - 3% de goma arábica e 2% de Hidroxipropil- β -ciclodextrina. * Valores expressos μmol de Trolox equivalente (TE) por 100 g de amostra em base seca.

Utilizando o método do radical DPPH, dentre todas as amostras de pós microencapsulados, a amostra com 4% de goma arábica e 1% de β -CD diferiu significativamente das amostras com 5% de goma arábica e com 3% de goma arábica e 2% de β -CD, sendo que estas últimas foram as amostras com maior retenção de atividade antioxidante (55,5% e 55% respectivamente). Os métodos baseados na eliminação de radicais livres, particularmente o método DPPH, são os métodos mais utilizados para determinação de atividade antioxidante (Meng et al., 2012). Souza et al. (2014) encontraram de 22,5 a 74,9 $\mu\text{mol TE/g}$ de extrato seco para o extrato de uva Bordo encapsulado por atomização a diferentes temperaturas e com diferentes percentuais de maltodextrina.

A determinação do potencial redox de uma substância é amplamente utilizada para avaliar a capacidade antioxidante, onde estão inclusos diversos métodos, que focam na capacidade redutora do antioxidante, principalmente a capacidade de reduzir íons de ferro (FRAP) e cobre (CUPRAC) (Meng et al., 2012). A partir dos resultados obtidos nas análises por CUPRAC, observa-se que as mesmas amostras apresentaram maior retenção da atividade antioxidante, que foram 59,2% e 58,8%

para os tratamentos com 5% de goma arábica e 3% de goma arábica e 2% de β -CD, respectivamente. Não houve diferença significativa entre estas duas amostras. Todas as demais amostras diferiram estatisticamente. Entretanto, para todas as amostras o valor de Trolox equivalente é maior para análise por CUPRAC do que para análise por DPPH, o que está de acordo com outros estudos que utilizaram esses dois métodos na determinação de atividade antioxidante (Meng et al., 2012; Suzme, Boyacioglu, Toydemir & Capanoglu, 2014).

Na atividade antioxidante por HRSA, o valor da atividade antioxidante do extrato não foi incluso na análise estatística, já que as diluições utilizadas inicialmente para realização das análises são diferentes para o extrato para as micropartículas. A maior atividade antioxidante (91,46%) foi encontrada para as micropartículas com 4% de goma arábica e 1% de HP- β -CD, seguida pelas micropartículas contendo 3% de goma arábica e 2% de HP- β -CD (89,37%) e por fim, com 4% de goma arábica e 1% de β -CD (86,97%). As amostras que apresentaram maior atividade antioxidante por DPPH e CUPRAC, apresentaram menor atividade antioxidante por este método em relação aos demais tratamentos.

Pode-se observar que as micropartículas que tiveram maior retenção da atividade antioxidante por DPPH e CUPRAC, foram as mesmas que apresentaram maior retenção de fenóis totais e antocianinas monoméricas totais, o que era esperado visto que são os polifenóis os principais responsáveis pela atividade antioxidante da uva.

3.3 Medição de cor

Os parâmetros de cor determinados nas micropartículas se encontram na Tabela 3. Pode-se observar que a luminosidade (L^*) diferiu significativamente entre todos os tratamentos. Os menores valores, que indicam que as amostras são mais escuras, foram encontrados para os três tratamentos que apresentaram maior concentração de compostos fenólicos e antocianinas: tratamento com 3% de goma arábica e 2% de HP- β -C, com 5% de goma arábica e com 3% de goma arábica e 2% de β -CD. Isto porque os compostos fenólicos, e dentre estes principalmente as antocianinas são os pigmentos responsáveis pela coloração da casca da uva (Monagas, Bartolomé & Gómez-Cardovés, 2005).

Tabela 3: Índices de cor (L^* , a^* , b^* , ângulo *Hue* e *Croma*) das micropartículas obtidas a partir do extrato aquoso de casca de uva Isabel, utilizando diferentes materiais de parede.

	L^*	a^*	b^*	<i>Hue</i> (°)	<i>Croma</i>
GA	56,97±0,01 ^A	41,40±0,11 ^A	0,96±0,01 ^A	1,33±0,02 ^A	41,41±0,11 ^A
GA/β-CD1	61,90±0,35 ^B	40,34±0,23 ^B	0,87±0,08 ^{A,B}	1,23±0,11 ^{A,B}	40,35±0,23 ^B
GA/β-CD2	60,70±0,18 ^C	40,85±0,21 ^C	0,76±0,06 ^B	1,07±0,08 ^{B,C}	40,86±0,21 ^C
GA/HP-β-CD1	66,14±0,14 ^D	36,41±0,04 ^D	0,25±0,03 ^C	0,39±0,05 ^D	36,41±0,04 ^D
GA/HP-β-CD2	53,20±0,18 ^E	43,09±0,31 ^E	0,70±0,13 ^B	0,94±0,17 ^C	43,10±0,31 ^E

Diferentes letras em uma mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). GA – 5% de goma arábica; GA/β-CD1 - 4% de goma arábica e 1% de β-ciclodextrina; GA/β-CD2 – 3% de goma arábica e 2% de β-ciclodextrina; GA/HP-β-CD1 – 4% de goma arábica e 1% de Hidroxipropil-β-ciclodextrina; e GA/HP-β-CD2 - 3% de goma arábica e 2% de Hidroxipropil-β-ciclodextrina.

Em relação ao parâmetro a^* , todos os resultados encontrados foram positivos, resultado característico de amostras com coloração avermelhada. Houve diferença significativa entre todos os tratamentos. Apesar da diferença entre as micropartículas ser estatisticamente significativa, ela foi pequena, e se observarmos os valores de a^* encontrados neste observa-se que foram muito superiores aos valores encontrados por Souza, Thomazini, Balieiro & Fávoro-Trindade (2013) para extrato de uva Bordo microencapsulado em diferentes temperaturas com diferentes percentuais de maltodextrina, que foram entre 24,86 e 27,84.

Quanto ao parâmetro b^* , todos os valores encontrados foram positivos, mas muito próximos ao 0, o que mostra que, apesar de serem vermelhas, as micropartículas possuem alguma tonalidade amarelada. A presença de compostos amarelos/marrons ocorre devido ao escurecimento não enzimático dos açúcares presentes na amostra, durante o processo de atomização (Nadeem et al., 2011; Quek, Chok & Swedlund, 2007).

Resultados encontrados por Peng, Li, Guan & Zhao (2013), reportam que a adição de β-CD como agente encapsulante na atomização (200 °C) de farinha de batata doce roxa não alterou os parâmetros L^* e a^* . Já Nadeem et al. (2011) relatam que o uso de goma arábica como agente encapsulante resultou nas amostras mais escuras e mais vermelhas, o que pode estar relacionado com a sua composição química, que possui diferentes açúcares juntamente com um complexo arabinogalacto-proteína, que torna as amostras mais propensas ao escurecimento não enzimático durante a secagem por atomização.

Apesar de haverem diferenças significativas entre algumas micropartículas para os valores do ângulo *Hue*, todas elas tiveram o valor próximo ao 0, permanecendo assim no primeiro quadrante, o que confirma a predominância de cor vermelha. Também houve diferença significativa entre todas os tratamentos para os valores do índice *Croma*, que quanto mais alto for, indica que há maior saturação de cor na amostra. Os valores variaram de 36 a 43, e foram maiores que os resultados encontrados por Khazaei et al. (2014) para antocianinas de pétalas de açafreão microencapsuladas com goma arábica, e também do que os resultados encontrados por Peng et al. (2013) para compostos bioativos de farinha de batata doce roxa com β -CD.

3.4 Determinação das propriedades físicas das micropartículas

Os resultados das análises das propriedades físicas de umidade, A_w , solubilidade, higroscopicidade e T_g das micropartículas se encontram na Tabela 4.

Tabela 4: Umidade, atividade de água, solubilidade, higroscopicidade e temperatura de transição vítrea das micropartículas obtidas a partir do extrato aquoso de casca de uva Isabel, utilizando diferentes materiais de parede.

	Umidade (%)*	A_w	Solubilidade (%)	Higroscopicidade (%)	T_g (°C)
GA	9,93±0,72 ^A	0,199±0,00 ^A	97,0±0,85 ^A	17,92±0,72 ^B	16,69±0,05 ^D
GA/β-CD1	9,74±0,47 ^A	0,179±0,00 ^B	92,8±0,57 ^{B,C}	18,12±0,23 ^{A,B}	29,66±0,04 ^B
GA/β-CD2	10,26±0,07 ^A	0,175±0,00 ^B	90,8±0,00 ^C	17,33±0,14 ^B	32,85±0,04 ^A
GA/HP-β-CD1	9,16±0,06 ^A	0,122±0,00 ^D	95,4±1,41 ^{A,B}	19,38±0,19 ^A	14,60±0,04 ^E
GA/HP-β-CD2	10,67±0,09 ^A	0,141±0,00 ^C	93,6±0,00 ^{B,C}	18,28±0,19 ^{A,B}	29,30±0,05 ^C

Diferentes letras em uma mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0.05$). GA – 5% de goma arábica; GA/ β -CD1 - 4% de goma arábica e 1% de β -ciclodextrina; GA/ β -CD2 – 3% de goma arábica e 2% de β -ciclodextrina; GA/HP- β -CD1 – 4% de goma arábica e 1% de Hidroxipropil- β -ciclodextrina; e GA/HP- β -CD2 - 3% de goma arábica e 2% de Hidroxipropil- β -ciclodextrina. *Valores expressos em base seca.

A umidade das amostras variou de 9,16 a 10,67%, não havendo diferença significativa entre os tratamentos. O percentual de umidade encontrado nos pós foi maior que o teor encontrado em outros produtos microencapsulados (Khazaei et al., 2014; Nadeem et al., 2012; Souza et al., 2013). Quek et al. (2007), observaram que o aumento de agente encapsulante (maltodextrina) resulta em redução da umidade

dos pós, devido ao aumento do teor de sólidos e reduz o teor de água que precisa ser evaporada, e sendo assim, pós com menor teor de umidade podem ser obtidos através do aumento do percentual de agente encapsulante adicionado. Nadeem et al. (2011) observaram este mesmo comportamento.

A A_w das amostras variou de 0,122 a 0,199, sendo que a maior A_w foi a da amostra com 5% de goma arábica, e as menores A_w foram dos tratamentos contendo HP- β -CD. De maneira geral os valores encontrados foram menores em relação a outros alimentos ricos em compostos fenólicos microencapsulados (Fang & Bandhari, 2012; Nadeem et al., 2011; Sahin-Nadeem, Dinçer, Torun, Topuz & Özdemir, 2013). A A_w é extremamente importante em pós, pois está diretamente relacionada à sua vida útil, ou seja, quanto maior a atividade de água, maior é o teor de água livre disponível para reações bioquímicas e, portanto, mais curto é seu prazo de validade (Quek et al., 2007).

Em relação à solubilidade, o maior valor encontrado foi para o tratamento com 5% de goma arábica, que não diferiu significativamente do tratamento com 1% de HP- β -ciclodextrina. Todos os outros tratamentos tiveram solubilidade significativamente menor do que o tratamento somente com goma arábica. Este resultado é justificável levando em consideração que a goma arábica possui alta solubilidade em água (Cano-Chauca et al., 2005; Tonon et al., 2010), e a β -CD é pouco solúvel em água (Uekama et al., 1998). Por outro lado, ao contrário do que era esperado, a utilização de HP- β -ciclodextrina não aumentou significativamente a solubilidade em relação ao uso de β -ciclodextrina. De forma geral, os resultados de solubilidade dos tratamentos foram satisfatórios, variando entre 97 e 90%, valor este igual ou superior a estudos semelhantes de microencapsulação alimentos ricos em polifenóis (Ahmed, Akter, Lee & Eun, 2010; Nadeem et al., 2011; Peng et al., 2013; Souza et al., 2013).

Os valores de higroscopicidade variaram de 17,3% a 19,3%, sendo este menor valor atribuído à amostra com 2% de β -CD e 3% de goma arábica, que só diferiu significativamente da amostra com maior percentual de higroscopicidade (tratamento com 1% de HP- β -CD e 4% de goma arábica). Este tratamento com maior percentual de higroscopicidade (19,3%) não diferiu significativamente do tratamento com 2% de HP- β -CD e do tratamento com 4% de goma arábica e 1% de β -CD. Silva et al. (2013) encontraram higroscopicidade de 17,55% no estudo da atomização do extrato da casca de jabuticaba utilizando uma mistura de goma

arábica e maltodextrina como agente encapsulante na temperatura de 160 °C. De acordo com Tonon et al. (2010) é desejável que os pós tenham baixa higroscopicidade, pois ela pode estar relacionada com uma degradação mais lenta de compostos fenólicos como as antocianinas, pois a menor adsorção de água que estas amostras apresentam, reduz a mobilidade molecular, tornando mais difícil a ocorrência de reações oxidativas.

Existem algumas dificuldades na secagem de extratos e sucos de frutas, devido à presença de altas quantidades de açúcares de baixo peso molecular e de ácidos orgânicos em sua composição, visto que, estes compostos possuem baixa Tg (Caliskan & Dirim, 2013; Vega, Goff e Roos, 2005), o que pode ocasionar problemas durante o processo, como aderência e aglomeração do produto no equipamento, resultando em baixo rendimento e em produtos com alta higroscopicidade, com tendência de formação de aglomerados (Bandhari & Howes, 1999; Cano-Chauca et al., 2005). A adição de agentes encapsulantes de elevada massa molar tendem a aumentar a Tg do produto final, diminuir sua higroscopicidade e conseqüentemente aumentar a sua estabilidade (Bandhari & Howes, 1999; Nayak & Rastogi, 2010; Truong, Bandhari & Howes, 2005). No entanto, é desejável que seja adicionada a quantidade ideal, ou seja, quantidade suficiente para que todo o composto de interesse seja encapsulado, e que ao mesmo não altere as propriedades do produto, considerando sempre o custo final do produto (Caliskan & Dirim, 2013).

A Tg dos pós microencapsulados, variou de 14,6 a 32,85 °C. Foi possível observar que os maiores valores de Tg foram encontrados para os tratamentos elaborados com β -CD, que tiveram pouca diferença entre si, seguidos pelo tratamento contendo 3% de goma arábica e 2% de HP- β -CD. A adição de 4% de goma arábica e 1% de HP- β -CD resultou na menor Tg, com valor muito próximo ao tratamento contendo 5% de goma arábica, e, além disso, apresentou o maior percentual de higroscopicidade. Peng et al. (2013) encontraram Tg de 54,3 °C para purê de batata doce roxa microencapsulada com 10% de β -CD.

Levando em consideração que o valor total utilizado de agente encapsulante nesse estudo foi de 5%, os valores de Tg encontrados foram aceitáveis. Além do baixo percentual de adição de material de parede, a adição de ácido cítrico para extração dos polifenóis da casca da uva também podem ter influenciado os valores de Tg, visto que, de acordo com Adhikari, Howes, Bhandari & Troung (2003), a Tg do ácido cítrico anidro pode ser menor que 12 °C.

Poucos dados são encontrados na literatura a respeito da Tg da goma arábica pura. De acordo com Righetto & Netto (2005) a Tg da goma arábica varia de 62 a 42,6 °C em atividades de água de 0,33 e 0,54 respectivamente, sendo que esta Tg baixa para 8,05 °C quando a goma arábica é utilizada na encapsulação de suco de acerola. Já em relação à β -CD, Krishnaswamy, Orsat & Thangavel (2012) encontraram uma média de 189 °C para Tg de três tipos de β -CD. Zheng & Chow encontraram Tg de aproximadamente 220 °C para HP- β -CD. Sendo assim, o baixo valor de Tg encontrado para a amostra com 5% de goma arábica pode estar relacionado com o fato da goma arábica possuir uma Tg mais baixa que as ciclodextrinas. Por outro lado, a adição de 1% de HP- β -CD não foi suficiente para aumentar a Tg das amostras, entretanto, a adição de 2% praticamente duplicou esse valor.

3.5 Microscopia eletrônica de varredura

Observando as microestruturas dos pós obtidos (Figura 1), observa-se a presença de partículas de vários tamanhos, com forte atração e aderência entre si, e formação de pontes de ligações entre elas. Este comportamento provavelmente ocorreu pela adição de um percentual de agente encapsulante relativamente baixo (5%) (Phisut, 2012), onde parte dos açúcares presentes na amostra podem ter permanecido na superfície das cápsulas, originando pós com teores relativamente altos de umidade. Yousefi, Emam-Djomeh & Mousavi (2011) encontraram estruturas similares para suco de romã microencapsulado com 12% de goma arábica, maltodextrina e amido ceroso. Cano-Chauca et al. (2005) também encontraram uma relativa aglomeração entre as partículas de suco de manga encapsulado com maltodextrina, goma arábica e amido ceroso.

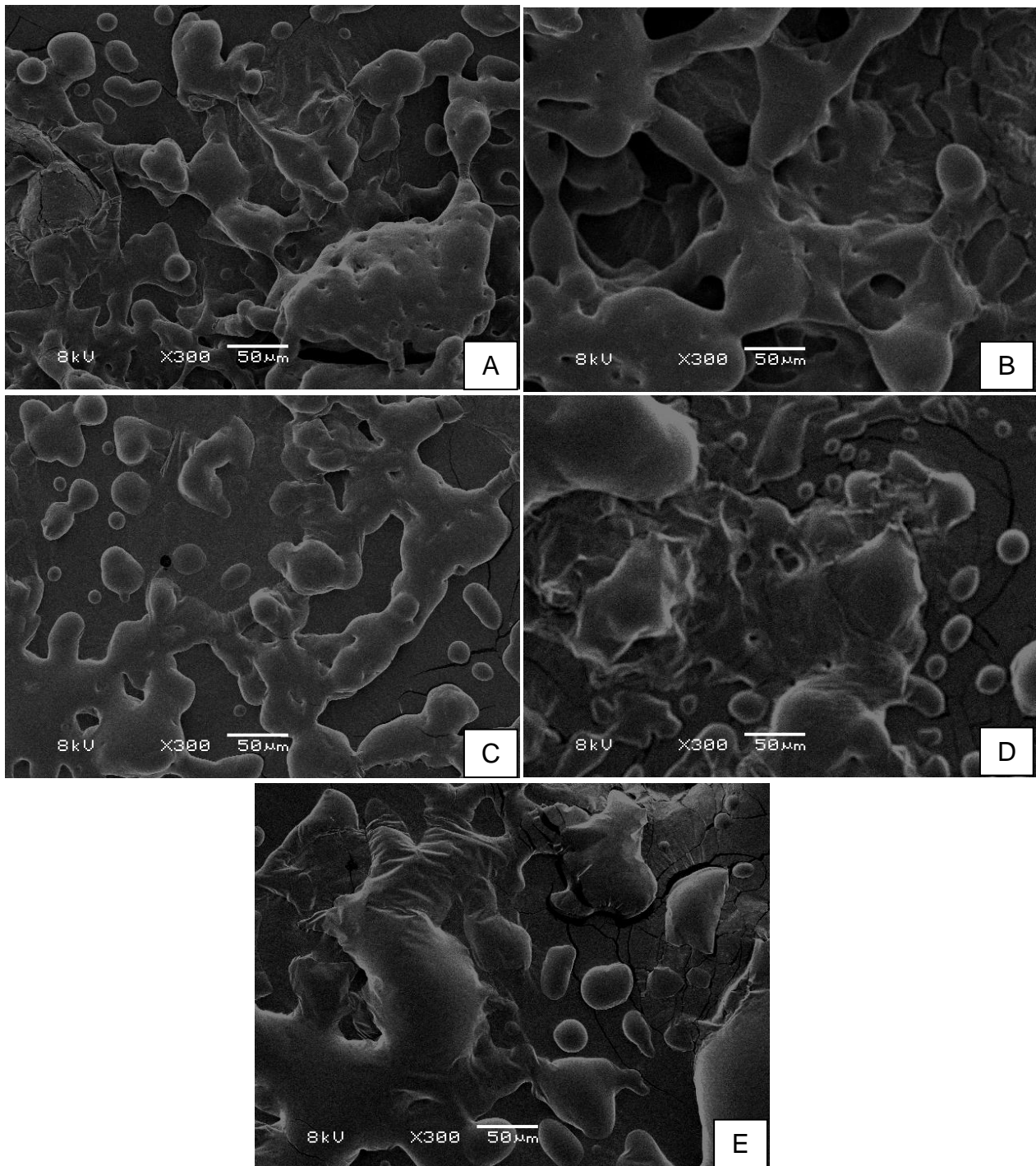


Fig. 1. Micrografias das micropartículas obtidas a partir extrato aquoso de casca de uva Isabel utilizando diferentes materiais de parede: A (5% de goma arábica); B (4% de goma arábica e 1% de β -ciclodextrina); C (3% de goma arábica e 2% de β -ciclodextrina); D (4% de goma arábica e 1% de hidroxipropil- β -ciclodextrina); e E (3% de goma arábica e 2% de hidroxipropil- β -ciclodextrina).

De acordo com Bhandari, Datta e Howes (1997), durante o processo de atomização de materiais com alto teor de açúcar, o produto obtido pode apresentar superfície amorfa e parcialmente cristalina ou totalmente cristalina, de acordo com as características do produto e condições de secagem. Os produtos amorfos são metaestáveis, e podem cristalizar ao longo do armazenamento (Bandari & Howes, 1999). Além disso, a forma amorfa de carboidratos de baixo peso molecular é muito higroscópica (Caliskan & Dirim, 2013; Vega, Goff e Roos, 2005), e sendo assim, se uma porção do produto ficar exposta à umidade após o processo de secagem, a temperatura de transição vítrea é modificada e a taxa de cristalização acelerada (Bandari & Howes, 1999). O empacotamento molecular ordenado característico da cristalização não pode acomodar o excesso de umidade, o que resulta na perda de água adsorvida e a absorção dessa água na superfície das partículas vizinhas, criando pontes líquidas entre as partículas, resultando na aglutinação destas (Bandari & Howes, 1999; Downton, Flores-Luna & King, 1982; Jouppila & Ross, 1994).

A taxa de aglutinação vai depender do conteúdo de umidade (através do seu efeito sobre a Tg) e da temperatura ambiente, sendo que, conforme ambos aumentam, há aumento da taxa de aglutinação (Aguilera, del Valle & Karel, 1995; Aguilera & Stanley, 1999). Quando observadas as microestruturas das amostras, observa-se que as mais higroscópicas (4% de goma arábica e 1% de β -CD, 4% goma arábica e 1% HP- β -CD e 3% goma arábica e 2% HP- β -CD), apresentaram uma maior tendência de aglutinação, com formação de pontes maiores entre as partículas.

4 Conclusão

Para as diferentes condições estudadas na elaboração das micropartículas, foram obtidas retenções acima de 50% para polifenóis totais e atividade antioxidante, sendo maiores para os tratamentos com GA/ β -CD (3:2 %) e 5% de GA. A solubilidade dos diversos pós obtidos variou de 90 a 97%, a higroscopicidade de 17,3 a 19,4% e a Tg de 14,6 a 32,6 °C. A microscopia mostrou a formação do fenômeno de aglutinação nas amostras. Foi verificado que o tratamento GA/ β -CD (3:2%) foi o que apresentou melhores resultados, com retenção de flavonoides de 67,2%, flavanols de 51,1%, atividade antioxidante de 55% (DPPH) e 59% (CUPRAC), higroscopicidade de 17,3% e Tg de 32,85 °C. A obtenção destes

compostos bioativos, aliados aos materiais de parede utilizados, resultaram em produtos com possíveis características funcionais. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar o efeito da utilização de maiores concentrações destes agentes encapsulantes.

5 Referências

- Adhikari, B., Howes, T., Shrestha, A. & Bhandari, B. R. (2007). Effect of surface tension and viscosity on the surface stickiness of carbohydrate and protein solutions. *Journal of Food Engineering*, 70, 1136-1143.
- Adiotomre, J., Eastwood, M. A., Edwards, C. A. & Brydon, W. G. (1990). Dietary fiber: in vitro methods that anticipate nutrition and metabolic activity in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 52, 128-134.
- Aguilera, J. M., del Valle, J. M. & Karel, M. (1995). Caking phenomena in amorphous food powders. *Trends in Food Science & Technology*, 61, 149-155.
- Aguilera, J. M. & Stanley, D. W. (1999). *Microstructural principles of food processing and engineering*. (2nd ed.). USA: Aspen.
- Ahmed, M., Akter, M. S., Lee, J. C. & Eun, J. B. (2010). Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. *LWT – Food Science and Technology*, 43, 1307-1312.
- Ali, B. H.; Ziada, A. & Blunden, G. (2009). Biological effects of gum arabic: A review of some recent research. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1-8.
- Amico, V., Napoli, E. M., Renda, A., Ruberto, G., Spatafora, C. & Tringali, C. (2004). Constituents of grape pomace from Sicilian cultivar 'Nerello Mascalese'. *Food Chemistry*, 88, 599-607.
- AOAC (1990). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Washington, DC.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproin: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.
- Arnous, A., Makris, D. P. & Kefalas, P. (2001). Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5736-5742.

- Bakker, J., Bridle, P. & Timberlake. (1986). Tristimulus measurements (CIELAB 76) of port wine colour. *Vitis*, 25, 67-78.
- Bakowska, A., Kucharska, A. Z. & Oszmianski, J. (2003). The effects of heating, UV irradiation, and storage stability of the anthocyanin-polyphenol copigment complex. *Food Chemistry*, 81, 349-355.
- Bakowska-Barczak, A. M. & Kolodziejczyk, P. P. (2011). Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products*, 34, 1301-1309.
- Bhandari, B. R., Datta, N., & Howes, T. (1997). Problems associated with spray drying of sugar-rich foods. *Drying Technology*, 15(2), 671-684.
- Bhandari, B. R. & Howes, T. (1999). Implication of glass transition for the drying and stability of dried foods. *Journal of Food Engineering*, 40, 71-79.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Burin, V. M., Rossa, P. N., Ferreira-Lima, N. E., Hillmann, M. C. R. & Boirdignon-Luiz, M. T. (2011). Anthocyanins: optimisation of extraction from Cabernet Sauvignon grapes, microencapsulation and stability in soft drink. *International Journal of Food Science & Technology*, 46, 186-193.
- Cai, Y. Z. & Corke, H. (2000). Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanins pigments. *Journal of Food Science*, 65(5), 2000.
- Caliskan, G. & Dirim, S. N. (2013). The effects of the different drying conditions and the amounts of maltodextrin addition during spray drying of sumac extract. *Food and Bioproducts Processing*, 91, 539-548.
- 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 and Emerging Technologies*, 6, 420-428.
- Cherbut, C., Michel, C., Raison, V., Kravtchenko, T. & Severine, M. (2003). Acacia gum is a bifidogenic dietary fibre with high digestive tolerance in healthy humans. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 15, 43-50.
- Crozier, A., Clifford, M. N. & Ashihara, H. (2006). *Plant Secondary Metabolites – Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Oxford: Blackwell Publishing, (Chapter 1).

- Davis, M. E. & Brewster, M. E. (2004). Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nature reviews/Drug Discovery*, 3, 1023-1035.
- Downton, G. E., Flores-Luna, J. L. & King, J. (1982). Mechanism of stickiness in hygroscopic, amorphous powders. *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals*, 21, 447-451.
- Fang, Z. & Bhandari, B. (2011). Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*, 129, 1139-1147.
- Fang, Z & Bhandari, B. (2012). Comparing the efficiency of protein and maltodextrin on spray drying of bayberry juice. *Food Research International*, 48, 478-483.
- FAOSTAT (2012). FAO Statistical Database. Agriculture Data. Available in: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (Accessed on: 12 June 2014).
- Fernandes, R. V. B., Borges, S. V. & Botrel, D. A. (2014). Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of Rosemary essential oil. *Carbohydrate Polymers*, 101, 524-532.
- Fortea, M. I., López-Miranda, S., Serrano-Martínez, A., Carreño, J. & Núñez-Delgado, E. (2009). Kinetic characterisation and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (Crimson Seedless). *Food Chemistry*, 113, 1008-1014.
- Garrido, J. & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols — A chemical perspective. *Food Research International*, 54, 1844–1858.
- Georgetti, S. R., Casagrande, R., Souza, C. R. F., Oliveira, W. P. & Fonseca, M. J. V. (2008). Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 41, 1521–1527.
- Gould, S. & Scott, R. C. (2005). 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): A toxicology review. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 1451-1459.
- Haidong, L., Fang, Y., Zhihong, T. & Changle, R. (2011). Study on preparation of β -cyclodextrin encapsulation tea extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49, 561-566.
- Hamama, A. A. & Nawar, W. W. (1991). Thermal decomposition of some phenolic antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1063-1069.
- Hernández-Herrero, J. A. & Frutos, M. J. (2014). Colour and antioxidant capacity stability in grape, strawberry and plum peel model juices pHs and temperatures. *Food Chemistry*, 154, 199-204.

- Jaya, S. & Das, H. (2004). Effect of maltodextrin, glycerol monostearate and tricalcium phosphate on vacuum dried mango powder properties. *Journal of Food Engineering*, 63, 125-134.
- Jouppila, K. & Roos, Y. H. (1994). Water sorption and time-dependent phenomena of milk powders. *Journal of Dairy Science*, 77, 1798-1808.
- Kalogeropoulos, N., Yannakopoulou, K., GiOXari, A., Chiou, A. & Makris, D. P. (2010). Polyphenol characterization and encapsulation in β -cyclodextrin of a flavonoid-rich *Hypericum perforatum* (St John's wort) extract. *LWT – Food Science and Technology*, 43, 882-889.
- Katalinic, V., Mozina, S. S., Skroza, D., Generalic, I., Abramovic, H., Milos, M., Ljubenkovic, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinc, P. & Boban, M. (2010). Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry*, 119, 715-723.
- Khazaei, K. M., Jafari, S. M., Ghorbani, M. & Kakhki, A. H. (2014). Application of maltodextrin and gum Arabic in microencapsulation of saffron petal's anthocyanins and evaluating their storage stability and color. *Carbohydrate Polymers*, 105, 57-62.
- Kishimoto, A., Ushida, K., Phillips, G. O., Ogasawara, T. & Sasaki, Y. (2006). Identification of intestinal bacteria responsible for fermentation of gum Arabic in pig model. *Current Microbiology*, 53, 173-177.
- Krishnaswamy, K., Orsat, V. & Thangavel, K. (2012). Synthesis and characterization of nano-encapsulated catechin by molecular inclusion with beta-cyclodextrin. *Journal of Food Engineering*, 111, 255-264.
- Lee, J., Durst, R. W. & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269-1278.
- Lucas-Abellán, C., Fortea, I., Gabaldón, J. A. & Núñez-Delgado, E. (2008). Encapsulation of quercetin and myricetin in cyclodextrins at acidic pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 255-259.
- Mantegna, S., Binello, A., Boffa, L., Giorgis, M., Cena, C. & Cravotto, G. (2012). A one-pot ultrasound-assisted water extraction/cyclodextrin encapsulation of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. *Food Chemistry*, 130, 746-750.

- Masters, K. (1991). *Spray Drying Handbook*. (5th ed.). England: Longman Scientific and Technical.
- Mazza, G. (1995). Anthocyanins in grape and grape products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35, 341-371.
- Meng, J. F., Fang, Y. L., Qin, M. Y., Zhuang, X. F. & Zhang, Z. W. (2012). Varietal differences among the phenolic profiles and antioxidant properties of flour cultivars of spine grape (*Vitis davidii* Foex) in Chongyi (China). *Food Chemistry*, 134, 2049-2056.
- Mercader-Ros, M. T., Lucas-Abellán, C., Fortea, M. I., Gabaldón, J. A. & Núñez-Delicado. (2010). Effect of HP- β -cyclodextrins complexation on the antioxidant activity of flavonols. *Food Chemistry*, 118, 769-773.
- Monagas, M., Bartolomé, B. & Gómez-Cordovés, C. (2005). Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 85-118.
- Nadeem, H. S., Torun, M. & Özdemir, F. (2011). Spray drying of the mountain tea (*Sideritis stricta*) water extract by using different hydrocolloid carriers. *Food Science and Technology*, 44, 1626-1635.
- Nayak, C. A. & Rastogi, N. K. (2010). Effect of selected additives on microencapsulation of anthocyanin by spray drying. *Drying Technology*, 28, 1396-1404.
- Nixdorf, S. L. & Hermosín-Gutiérrez, I. (2010). Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: phenolic composition and antioxidant capacity. *Analytica Chimica Acta*, 659, 208–215.
- Peng, Z., Li, J., Guan, Y. & Zhao, G. (2013). Effect of carriers on physicochemical properties, antioxidant activities and biological components of spray-dried purple sweet potato flours. *LWT – Food Science and Technology*, 51, 348-355.
- Phisut, N. (2012). Spray drying technique of fruit juice powder: some factors influencing the properties of product. *International Food Research Journal*, 19(4), 1297-1306.
- Pinelo, M., Arnous, A. & Meyer, A. S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 579-590.

- Pralhad, T. & Rajendrakumar, K. (2004). Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34, 333-339.
- Quek, S. Y., Chok, N. K. & Swedlunk, P. (2007). The physicochemical properties of spray-dried watermelon powder. *Chemical Engineering and Processing*, 46, 386–392.
- Ratnasooriya, C. C. & Rupasinghe, V. (2012). Extraction of phenolic compounds from grapes and their pomace using β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, 134, 625-631.
- Righetto, A.M. & Netto, F.M. (2005). Effect of encapsulating materials on water sorption, glass transition and stability of juice from immature acerola. *International Journal of Food Properties*, 8(2), 337–346.
- Rodrigo, R., Miranda, A. & Vergara, L. (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*, 412, 410-424.
- Rosa, C. G., Borges, C. D., Zambiazzi, R. C., Nunes, M. R., Benvenuti, E. V., Luz, S. R., D'Avila, R. F. & Rutz, J. K. (2013). Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β -cyclodextrin and xanthan. *Industrial Crops and Products*, 46, 138-146.
- Rosa, C. G., Borges, C. D., Zambiazzi, R. C., Rutz, J. K., Luz, S. R., Krumreich, F. D., Benvenuti, E. V. & Nunes, M. R. (2014). Encapsulation of the phenolic compounds of the blackberry (*Rubus fruticosus*). *LWT – Food Science and Technology*, 58, 527-533.
- Sahin-Nadeem, H., Dinçer, C., Torun, M., Topuz, A. & Özdemir, F. (2013). Influence of inlet air temperature and carrier material on the production of instant soluble sage (*Salvia fruticosa* Miller) by spray drying. *LWT – Food Science and Technology*, 52, 31-38.
- Sancho, M. I., Gasull, E., Blanco, S. E. & Castro, E. A. (2011). Inclusion complex of 2-chlorobenzophenone with cyclomaltoheptaose (β -cyclodextrin): temperature, solvent effects and molecular modeling. *Carbohydrate Research*, 346, 1978-1984.
- Sansone, F., Picerno, P., Mencherini, T., Villecco, F., D'Ursi, A.M., Aquino, R.P. & Lauro, M.R. (2011). Flavonoid microparticles by spray-drying: Influence of

- enhancers of the dissolution rate on properties and stability. *Journal of Food Engineering* 103, 188–196.
- 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* (pp.445–498), 4th ed. Porto Alegre: Artmed.
- Shahidi, F. & Han, X.Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 33 (6), 501–547.
- Silva, P. I., Stringheta, P. C., Teófilo, R. F. & 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, 538–544.
- Singleton, V. L. & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Souza, V. B., Fujita, A., Thomazini, M., Silva, E. R., Lucon, J. F. J., Genovese, M. I. & Favaro-Trindade, C. S. (2014). Functional properties and stability of spray-dried pigments from Bordo grape (*Vitis labrusca*) winemaking pomace. *Food Chemistry*, 164, 380–386.
- Souza, V. B., Thomazini, M., Bailieiro, J. C. C. & Favaro-Trindade, C. S. (2013). 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*, DOI: 10.1016/j.fbp.2013.11.001.
- Stella, V. J. & He, Q. (2008). Cyclodextrins. *Toxicologic Pathology*, 36, 30–42.
- Su, Y. L., Fu, J. Y., Zhang, J. Y., Wang, W. M., Wang, H., Wang, Y. C. & Zhang, Q. J. (2008). Microencapsulation of Radix salvia miltiorrhiza nanoparticles by spray-drying. *Powder Technology*, 184, 114–121.
- Suzme, S., Boyacioglu, D., Toydemir, G. & Capanoglu, E. (2014). Effect of industrial juice concentrate processing on phenolic profile and antioxidant capacity of black carrots. *International Journal of Food Science & Technology*, 49, 819–829.
- Szejtli, J. (1998). Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews*, 98, 1743–1753.

- Szente, L. & Szejtli, J. (2004). Cyclodextrin as food ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 137-142.
- Toaldo, I. M., Fogolari, O., Pimentel, G. C., Gois, J. S., Borges, D. L. G., Caliari, V. & Bordignon-Luiz, M. (2013). Effect of grape seeds on the polyphenol bioactive content and elemental composition by ICP-MS of grape juices from *Vitis labrusca* L., *LWT – Food Science and Technology*, 53, 1-8.
- Tonon, R. 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, 411-418.
- Tonon, R. V., Brabet, C. & Hubinger, M. D. (2010). Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*, 43, 907-914.
- Truong, V., Bhandari, B. R. & Howes, T. (2005). Optimization of co-current spray drying process of sugar-rich foods. Part I – Moisture and glass transition temperature profile during drying. *Journal of Food Engineering*, 71, 55-65.
- Uekama, K., Hirayama, F. & Irie, T. (1998). Cyclodextrin Drug Carrier Systems. *Chemical Reviews*, 98, 2045-2076.
- Valle, E. M. M. D. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39, 1033-1046.
- Vega, C., Goff, H. D. & Roos, A. Y. H. (2005). Spray drying of high-sucrose dairy emulsions: feasibility and physicochemical properties. *Journal of Food Science*, 70(3), 2005.
- Waleczek, K. J., Marques, H. M. C., Hempel, B. & Schmidt, P. C. (2003). Phase solubility studies of pure (-)- α -bisabolol and chamomile essential oil with β -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 55, 247-251.
- Wang, J., Cao, Y., Sun, B. & Wang, C. (2011). Characterisation of inclusion complex of *trans*-ferulic acid and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, 124, 1069-1075.
- Xu, C., Zhang, Y., Cao, L. & Lu, J. (2010). Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. *Food Chemistry*, 119, 1557-1565.

- Yang, J., Meyers, K. J., Heide, J. V. D. & Liu, R. H. (2004). Varietal differences in phenolic content and antioxidant and antiproliferative activities of onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6787-6793.
- Yousefi, S., Emam-Djomeh, Z. & Mousavi, S. M. (2011). Effect of carrier type and spray drying on the physicochemical properties of powdered and reconstituted pomegranate juice (*Punica Granatum* L.). *Jornal of Food Science and Technology*, 48(6), 677-684.
- Zheng, Y. & Chow, A. H. L. (2009). Production and characterization of spray-dried hydroxypropyl- β -cyclodextrin/quercetin complex. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 35(6), 727-734.
- Zhishen, J., Mengheng, T. & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559.

CAPÍTULO 3

Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents

Luiza Siede Kuck^a, Caciano Pelayo Zapata Noreña^{a,*}

^aLaboratório de Engenharia de Processos em Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43.212, Campus do Vale, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43.212, Campus do Vale, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil Tel.: +55 051 3308 6673; fax: +55 051 3308 7048.

E-mail address: czapatan@ufrgs.br (C. P. Z. Noreña).

Artigo publicado na revista Food Chemistry

(v.194, p.569-576, 2016)

Abstract

Bordo grape skin extract was microencapsulated by spray-drying and freeze-drying, using gum arabic (GA), partially hydrolyzed guar gum (PHGG), and polydextrose (PD) as encapsulating agents. Total phenolics and total monomeric anthocyanin, antioxidant activity, color, moisture, water activity (*aw*), solubility, hygroscopicity, glass transition temperature (*T_g*), particle size, and microstructure of the powders were evaluated. The retention of phenolics and anthocyanins ranged from 81.4 to 95.3%, and 80.8 to 99.6%, respectively, while the retention of antioxidant activity ranged from 45.4 to 83.7%. Treatments subjected to spray-drying had lower moisture, *aw*, and particle size, and greater solubility, while the freeze-dried samples were less hygroscopic. *T_g* values ranged from 10.1 to 52.2 °C, and the highest values corresponded to the spray-dried microparticles. The spray-dried particles had spherical shape, while the freeze-dried powders showed irregular structures. The spray drying technique and the use of 5% PHGG and 5% PD has proven to be the best treatment.

Keywords: spray-drying. freeze-drying. polyphenols. anthocyanins. antioxidant activity.

1. Introduction

Grape is one of the main natural sources of phenolic compounds, thus it has been associated to important health benefits (Toaldo et. al., 2013). American grape varieties (*Vitis labrusca* L.) are widely cultivated in Brazil, mainly for the production of juices and table wines, and Bordo, Concord and Isabel are the most cultivated varieties. Bordo variety is characterized by high amounts of polyphenols, intense purple-red color, and fruity aroma (Lago-Vanzela, Da-Silva, Gomes, García-Romero & Hermosín-Gutiérrez, 2011).

Although the grape skin accounts for 50% by weight of a grape berry, after production of juices and wines, most peel and seeds are removed, which have been found to contain higher amounts of polyphenols than the pulp (Toaldo et al. 2013).

The polyphenols found in Bordo grape skins are flavonoids, especially anthocyanins, some monomers and dimers of the group of flavan-3-ols, and non-flavonoids such as hydroxycinnamic acids and stilbenes, particularly resveratrol (Lago-Vanzela et al., 2011). These compounds possess antioxidant activity, whose

function is to neutralize and prevent the formation of free radicals (Rice-Evans, Miller & Paganga, 1997), resulting in health benefits, such as cardioprotective effect, anti-cancer, anti-diabetes, anti-microbial, and anti-inflammatory properties, besides acting against neurodegenerative diseases, kidney disease, and aging (Rodrigo, Miranda & Vergara, 2011).

In food processing and storage, the polyphenols are unstable under various conditions such as presence of oxidative enzymes, high temperature conditions, pH, moisture, presence of light and oxygen (Fang & Bhandari, 2011). In this context, encapsulation is an alternative process to increase the stability of susceptible compounds, protecting them from adverse environmental conditions.

Although various types of encapsulating agents can be used, some characteristics should be observed, including their ability to form films, biodegradability, resistance to gastrointestinal tract, viscosity, solids content, hygroscopicity, and cost (Silva, Stringheta, Teófilo & Oliveira, 2013).

The most common wall materials for encapsulating juices and fruit extracts are maltodextrins and gum Arabic (GA) (Tonon, Brabet, Pallet, Brat & Hubinger, 2009). GA is used mainly due to their high water solubility characteristics, low viscosity, and emulsifying properties (Cano-Chauca, Stringheta, Ramos & Cal-Vidal, 2005). However, despite the good properties, an encapsulating agent may hardly present all the characteristics required. Thus, the use of wall material mixtures is an alternative to further increase the efficiency of the encapsulation process.

The partially hydrolyzed guar gum (PHGG) and polydextrose (PD) are potential encapsulating agents, despite being little studied for encapsulation of food. The PHGG has no taste, color or odor, low viscosity, and is highly soluble in water (Kapoor & Juneja, 2009). PD is a low-calorie polysaccharide, highly soluble in water, odorless, colorless in solution, and does not give food sweet taste, thus not interfering with the application in foods (Mitchell, 1996).

This study aimed to encapsulate the Bordo grape skin phenolic extract by spray-drying and freeze-drying, using different combinations of gum Arabic, partially hydrolyzed guar gum, and polydextrose as encapsulating agents, and to evaluate the physical, chemical and morphological characteristics of the microparticles.

2. Material and methods

2.1. *Materials*

The grapes were obtained from a farm located in Cotiporã, Rio Grande do Sul, Brazil, in 2014. The grape clusters were selected, washed in water, packed in polyethylene bags and frozen at -18 °C until use. The encapsulating agents were: gum Arabic (Instantgum BA, Nexira Brasil Com Ltda, Brasil), Polydextrose (MasterSense Ing Alim Ltda, Brasil), and partially hydrolyzed guar gum (Sunfiber R, R & S Blumos, Com. Prod. Alimentícios Ltda., Brasil). DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid), neocuproine, and gallic acid were purchased from Sigma-Aldrich. All reagents were analytical grade.

2.2. *Preparation of the extracts*

The grapes were thawed and blanched at 80 °C for 5 minutes and cooled on ice/water bath for 3 minutes. After separating the seeds from pulp, the polyphenols were extracted from skins using water acidified with citric acid (2%, w / v). Peels were mixed with solvent at a ratio of 1: 3 (w / v), the mixture was ground in a blender, and kept in the dark for 20 hours at 22±1 °C. After this period, the extract was filtered with Whatman filter paper No. 1 for separating the solid residue.

2.3. *Preparation of microencapsulated powders*

Four dispersions were prepared from the extract, as follows: A (5% GA and 5% PD), B (10% GA), C (5% PHGG and 5% PD), and D (10% of PHGG). The dispersions were prepared at 6500 rpm for 5 minutes using an Ultra-Turrax (T25, IKA). Subsequently, dispersions were encapsulated by spray-drying and freeze-drying, totaling eight treatments.

Encapsulation by spray-drying was performed using a dual fluid atomizer, pneumatic type (Mini Spray Dryer LM MSDI 1.0 LABMAQ, Brasil), with a feed nozzle diameter of 1.0 mm. Feeding was carried out using a peristaltic pump at a flow rate of 0.60 L / h, drying air temperature 140 °C, air pressure 3.5 kgf / cm², and air flow rate 40.5 L / h.

For freeze-drying, the dispersions were frozen in ultra-freezer at - 68 °C for 24 hours. Then, the samples were placed in a freeze-dryer (LIOTOP L101, Liobras,

Brasil) and freeze-dried at $-57\text{ }^{\circ}\text{C}$, at vacuum pressure less than 200 mmHg for 48 hours. After freeze-drying, the samples were crushed using a mortar and pestle.

The spray-dried and freeze-dried samples were immediately placed in polyethylene bags, sealed and placed in aluminum pouches. The samples were stored in a desiccator containing silica for further analyses, which were performed in triplicate.

2.4. Spectrophotometric analysis

The extract and the microencapsulated powders were diluted with distilled water in different proportions according to the needs of each analysis. All readings were performed in spectrophotometer Genesys S10, Thermo Scientific.

2.4.1. Total phenolics

The total phenolics were determined using the Folin-Ciocalteu reagent (Singleton & Rossi, 1965). The readings were made in spectrophotometer at 765 nm, and the results were expressed as mg gallic acid (GAE) per g sample on dry basis.

2.4.2. Total monomeric anthocyanins

The total monomeric anthocyanins were determined according to the methodology described by Lee, Durst and Wrolstad (2005). The extract and the diluted powders were mixed with buffer solutions pH 1.0 and 4.5. The absorbance was measured in spectrophotometer at 520 and 700 nm. The results were expressed as mg malvidin-3,5-diglucoside per g sample on dry basis, using molar absorptivity $37000\text{ l / cm / mol}$, and molecular weight 724.5 g / mol (Toaldo et al., 2013).

2.4.3. DPPH• scavenging capacity

The antioxidant activity was determined by DPPH assay as reported by Brand-Williams, Cuvelier and Berset (1995). The absorbance was measured in a spectrophotometer at 515 nm after 3 hours of reaction. A Trolox standard curve was previously prepared and the results were expressed as $\mu\text{mol Trolox equivalent (TE)}$ per g sample on dry basis.

2.4.4. Cupric-reducing antioxidant capacity (CUPRAC)

The CUPRAC assay was performed according to the methodology described by Apak, Güçlü, Özyürek and Karademir (2004). The absorbance was measured in a spectrophotometer at 450 nm 60 minutes after the reaction. A Trolox standard curve was made and the results were expressed as $\mu\text{mol TE per g sample}$ on dry basis.

2.4.5 Hydroxyl radical-scavenging activity (HRSA)

The antioxidant activity by HRSA assay was performed as described by Meng Fang, Qin, Zhuang and Zhang (2012). The absorbance was measured in spectrophotometer at 593 nm. The result was expressed as % scavenging, and calculated according to the following equation:

$$\text{Scavenging activity (\%)} = [1 - (A_{\text{sample}}/A_{\text{control}})] \times 100\%.$$

2.5. Colorimetric analysis

The color of the microencapsulated powders was measured using a colorimeter (CR400 / 410, Minolta Co. Ltd., Osaka, Japan), according to the CIELAB (L^* , a^* , b^*) system, where L^* indicates lightness (0 = black and 100 = white), a^* and b^* are coordinates for green ($-a^*$) / red ($+a^*$), and blue ($-b^*$) / yellow ($+b^*$). The instrument was calibrated using white ceramic plate. Hue angle ($H^* = \tan^{-1} b^* / a^*$) was calculated, which indicates the color of the sample (0° or $360^\circ = \text{red}$, $90^\circ = \text{yellow}$, $180^\circ = \text{green}$, and $270^\circ = \text{blue}$), while Chroma ($C^* = [a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$) indicates color's purity or saturation.

2.6. Determination of the physical properties of the microencapsulated powders

Moisture content of the samples was calculated from the weight loss after heating the sample at 105°C according to AOAC method 984.25 (1990).

Water activity (A_w) was measured by direct reading in electronic meter (Aqualab 3TE-Decagon, Pullman, USA) according to AOAC method 978.18 (1990).

Solubility was determined according to Cano-Chauca et al. (2005) with some modifications. 1 g sample and 100 mL distilled water were mixed in a beaker and stirred in a magnetic stirrer (Lab Disc, IKA) for 5 minutes. Then, the solution was placed in a tube and centrifuged at $3000 \times g$ (Thermo 16R, Thermo Scientific) for 15 minutes. An aliquot of 25 mL of the supernatant was transferred to a 50 mL beaker

and oven-dried at 105 °C to constant weight. The solubility (%) was calculated by weight difference.

For determination of the hygroscopicity, 1 g of powder sample was weighed and placed in an airtight glass container with saturated NaCl (relative humidity of 75%), and stored in an incubator chamber (411 / FDP Ethik Technology, Brasil) at 25 °C (Tonon, Brabet & Hubinger, 2008). After one week, samples were weighed every 24 hours until equilibrium was reached. The hygroscopicity was expressed as percentage (%) or 1 g of adsorbed moisture per 100 g dry solids (g/100 g) (Caparino, Tang, Nindo, Sablani, Powers & Fellman, 2012).

The glass transition temperature (T_g) of the samples was determined by differential scanning calorimetry (DSC) (DSC Q2000, TA Instruments, New Castle, DE). Approximately 8 mg sample were placed in aluminum hermetic pans (Tzero, TA Instruments). An empty aluminum pan was used as reference. The purge gas was ultra-pure nitrogen (flow 50 mL / min). The temperature ranged from -80 °C to 120 °C at a heating rate of 40 °C / min. The T_g values were calculated using the software TA Universal Analysis 5.5.3.

2.7. Particle morphology and size distribution

The particle structure was evaluated by scanning electron microscope (JSM 6060, JEOL Ltd., Japan). The samples were fixed on stubs using double-sided tape carbon, metallized with carbon, and further examined in the microscope operating at a voltage of 8 kV and 300 x magnification for the freeze-dried powders, and 2000x for spray-dried powders.

The particle size distribution was determined in particle size analyzer by laser diffraction (CILAS 1180, Compagnie Industrielle de Lasers, France). Samples were dispersed in isopropyl alcohol under constant stirring and sonicated using ultrasound equipment for 30 seconds. The mean diameter (D [4, 3]) and the equivalent volume diameters at 10%, 50%, and 90% cumulative volume were determined. The particle size distribution in the powder (span) was calculated using the following equation: $\text{Span} = [(d_{90} - d_{10}) / d_{50}]$ (Fernandes, Borges & Botrel, 2014).

2.8. Statistical analysis

Data were subjected to ANOVA, and the treatments to Tukey's multiple comparison tests, using the program SAS 9.3.

3. Results and Discussion

3.1. Total phenolics, total monomeric anthocyanins and antioxidant activity

The total phenolics, total monomeric anthocyanins and the antioxidant activity of grape skin aqueous extract and microencapsulated powders are shown in Table 1.

Regarding the total phenolics content, the values were significantly lower for all microencapsulated powders when compared to the original extract. The retention percentages ranged from 95.3% to 81.4% for the spray-dried treatment with 10% GA, and the freeze-dried treatment with 5% PHGG and 5% PD, respectively. Polyphenols losses during the drying process can occur due to several factors. In the spray-drying process, phenolics losses are related to exposure to oxygen and high temperatures, which may have caused degradation and polymerization thereof. In the lyophilization process, the grinding of the freeze-dried product may lead to degradation compounds, since the product's exposure may induce the occurrence of oxidation reactions. Golde, Westelaken, Bouma and Wiel (2004) freeze-dried wine samples, and found approximately 70% of the original phenolics. The authors suggested that further studies are needed to investigate at which step the losses occur.

Both the spray drying and freeze drying may result in the formation of microspheres, which is a dispersion of the active compounds within a structure made of a continuous phase of one or more polymers (Mathiowitz, Kreitz & Brannon-Peppas, 1999). In addition, when the microparticles are produced by spray drying, rapid evaporation of water caused by the use of high temperatures may result in formation of fissures and concavities in the surfaces, which cause a premature release of the encapsulated component, and this way its degradation (Ramírez, Giraldo & Orrego, 2015). In the other hand, freeze drying leads the formation of pores in the microparticle, due to the sublimation of water. In this study, spray dried samples had a reduction of 4.7 to 18.4%, while that freeze dried samples had a reduction of 6.4 to 18.6% in the total phenolics. So, there was not a great difference in the losses of polyphenols between the two methods. Although a reduction of total phenolics was observed in this study, a good retention (95.3% to 81.4%) was obtained, with percentages close to or higher than the values found in literature, as 94.5% retention of phenolics from açai pulp encapsulated with GA (Tonon et al., 2009).

The spray-dried treatment containing 10% GA presented the highest retention of phenolic compounds. The high efficiency of encapsulation with gum Arabic is

related to its structure, since it is a highly branched heteropolymer of sugar, having a small amount of protein covalently linked to the carbohydrate chain, acting as an excellent agent film formation, which allows effective encapsulation of molecules (Burin, Rossa, Ferreira-Lima, Hillmann & Boirdignon-Luiz, 2011). However, no significant differences were observed for the freeze-dried treatments with 5% GA and 5% PD, and spray-dried treatments with 5% PHGG and 5% PD, indicating the potential of PHGG and PD for encapsulation of phenolic compounds.

The retention of anthocyanins in the powder was in the range of 99.58 to 80.75%. The higher retention was found for both spray-dried treatments made with PHGG, with no significant differences when compared to the initial extract. The other treatments did not differ significantly from each other. Ferrari, Germer, Alvim, Vissotto and Aguirre (2012) found 78.2% retention of anthocyanins in blackberry extract encapsulated with 7% GA, and Souza, Thomazini, Balieiro and Favaro-Trindade (2015) found 88.3 to 93.8 % retention of anthocyanins when 10% maltodextrin was used for encapsulating grape skin aqueous extract.

The antioxidant activity of the microencapsulated powders by DPPH assay decreased when compared to the initial extract, and the retention ranged from 45.4 to 59.1%, with the highest values for the freeze-dried samples with 5% GA and 5% PD, followed by the spray-dried samples with 5% PHGG and 5% PD, with no significant differences between them, and the spray-dried sample with 5% GA and 5% PD. The values were according to those found by Souza et al. (2015), 69.7 at 74.9 $\mu\text{mol TE} / \text{g}$ dry sample in the encapsulation of Bordo grape skin phenolic extract with 10% maltodextrin. When measured by the CUPRAC assay, the retention of the antioxidant activity was in the range of 73.1 at 83.7% when compared to the initial extract. The highest values were found for the spray-dried treatments with 10% GA, and 5% PHGG and 5% PD. Both the extract as microparticles had lower antioxidant activity by DPPH when compared to CUPRAC assay, which has also been observed by other authors (Meng et al., 2012).

For the antioxidant activity by HRSA, the highest values were found for the freeze-dried treatment with 5% GA and 5% PD, spray-dried treatment with 10% PHGG, and freeze-dried treatment with 5% PHGG and 5% PD, all with values near 84%. Zheng, Ding, Zhang and Sun (2011) used a similar method to evaluate the antioxidant activity of microencapsulated bayberry polyphenols, and found 83.13% activity when analyzing the diluted powder at a concentration of 6 mg / mL.

3.2. Colorimetric analysis

Table 2 shows the results of the color parameters. A difference in color was evidenced by the L^* values, once the freeze-dried powder was darker, with L^* values between 20 and 22, and the spray-dried powders were clearer with values between 37 and 40. During freeze-drying, the products' color can be related to the pore size on the surface (Aguilera & Lillford, 2008). Freezing leads to the formation of ice crystals, altering the pore structure after water sublimation. Thus, the surface of these particles is darker due to light scattering properties of the empty spaces after sublimation (Aguilera & Stanley, 1999). The kind of wall material used did not influence the results of freeze dried treatments, while that in the spray dried, the use of polydextrose decreased the luminosity values. This may be consequence of the formation of some dark compounds during the drying process.

The results obtained for the values of a^* and b^* show that all data were located in the second quadrant ($+a^*$, $-b^*$), indicating a tendency to blue and red, characteristic of anthocyanins. A similar result was found for the Bordo grape skin aqueous extract encapsulated with 10% maltodextrin by spray-drying (Souza et al., 2015). The spray dried samples had a deeper red color, as indicate the larger positive a^* values, than the freeze dried samples. In relation to b^* values, the difference between spray and freeze dried samples were lower.

The Hue angle values between 348 and 359 confirmed the tendency of the samples to the red hue (Hue = 360), with the highest values for freeze-dried treatments, which were also darker. Chroma was higher for the spray-dried sample, which means that these samples have higher saturation or color purity, which is a desirable characteristic.

3.3. Physical properties of the microencapsulated powders

The parameters moisture content, water activity, and hygroscopicity are essential for powder stability and storage, while solubility is associated with reconstitution of the powder (Tonon et al., 2008).

As can be seen in Figure 1A, the lowest moisture contents were found for the spray-dried treatments, which did not differ significantly from each other, and ranged from 2.41 to 2.57%. Souza et al. (2015) found 2.96% moisture for grape extract microencapsulated with 10% maltodextrin by spray drying at 170 °C. In contrast, the moisture content of the freeze-dried powders was higher than that the spray-dried

powders, ranging from 7.65 to 8.06%, with no significant difference between them. Freezing temperatures lower than $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ result in rapid freezing, and hence the pores in the outer layer are smaller, which may hinder mass transfer and act as a barrier against sublimation, resulting in increased moisture retention (Ezhilarasi, Indrani, Jena & Anandharamakrishnan, 2013).

The water activity of the treatments (Figure 1B) ranged from 0.160 to 0.360, and all treatments were significantly different from each other, except for the spray-dried samples with 10% GA, and 5% GA and 5% PD. The highest a_w values, about 0.3, were found for the freeze-dried samples. Gurak, Cabral and Rocha-Leão (2013) found a_w of 0.43 for grape juice microencapsulated with maltodextrin by freeze-drying, while Tonon et al. (2008) found a_w of 0.244 for acai pulp encapsulated with GA by spray-drying.

In this study, the kind of wall material used had no significant effect on the solubility of the powders, while that the applied drying method had a significant influence. The powders obtained by spray-drying exhibited higher solubility than the freeze-dried powders (Figure 1C), which ranged from 94.3 to 97.99 % and 85.96 to 88%, respectively, with no significant differences between the spray-dried or freeze-dried treatments. Souza et al. (2015) found solubility of approximately 91% for the Bordo grape aqueous extract encapsulated with 10% maltodextrin by spray-drying at $130\text{ }^{\circ}\text{C}$. The higher solubility may be related with the smaller particle size obtained, because the smaller the particle size the greater the surface area available for hydration.

The hygroscopicity values (Figure 1D) ranged from 11.67 to 16.61%, values close to those found in the literature for similar encapsulated products. Silva et al. (2013) found hygroscopicity of 17.75% for jaboticaba bark extract encapsulated with a mixture of GA and maltodextrin, while Souza et al. (2015) found hygroscopicity values between 12.4 and 17.4% for Bordo grape pigment encapsulated with maltodextrin. The hygroscopicity of juices and powdered fruit extracts is related to the low molecular weight sugars and organic acids with low T_g , and moisture content, which leads to a high hygroscopicity (Bhusari, Muzaffar & Kumar, 2014; Ferrari et al., 2012; Tonon et al., 2008).

Among the spray-dried samples, the lowest hygroscopicity was observed in the treatment with 5% PHGG and 5% PD. The freeze-dried treatments showed the lowest hygroscopic values, despite having the highest moisture contents. Khazaei,

Jafari, Ghorbani and Kakhki (2014) found no relationship between moisture and hygroscopicity of saffron petal's anthocyanins microencapsulated with gum Arabic and maltodextrin by freeze-drying. The lower hygroscopicity values found for the freeze-dried powders can be related to the larger particle size when compared to the spray-dried product (Man, Irwandi & Abdullah, 1999), because the larger the particle size, the lower the exposed surface area and consequently the lower the water absorption is (Tonon et al., 2009).

Tg values are related to the powder stability during storage, thus the higher the Tg value, the greater the powder stability. The Tg of the microencapsulated powders (Figure 1E) ranged from 10.98 to 52.2 °C. All freeze-dried treatments, except the treatment with 10% GA, had low Tg values (11 to 26 °C). On the other hand, the spray-dried treatments showed values between 42 and 52 °C. Tg is affected by several factors, such as molecular weight, chemical structure, and moisture content of the material (Fernandes et al., 2014). In juices and fruit extracts the presence of high amounts of low molecular weight sugars and acids results in low Tg (Adhikari, Howes, Bhandari & Troung, 2004). However, as consequence of adding carrier material, the final Tg is also related to the molecular weight of polymers presents in this material (the Tg increases with increasing molecular weight), as well as water content. Among the three encapsulating agents used in this study, PD has the lowest molecular weight (less than 5,000 Da) (Mitchell, 1996), followed by PHGG (average of 20,000 Da) (Kapoor et al., 2009) and GA (average of 350,000 Da) (Al-Assaf, Philips & Williams, 2005). The addition of PD reduced Tg, except for the freeze-dried treatment with PHGG (5% PD and 5% PHGG), which did not differ significantly from the treatment with 10% PHGG. The freeze-dried treatments had lower Tg due to their higher moisture contents. However, this was not observed in the freeze-dried treatment with 10% GA, probably due to compensation for the higher GA content, which has the highest molecular weight among the encapsulating agents used.

3.4. Particle morphology and size distribution

The particle size distribution in all treatments was bimodal. Table 3 shows the average size and the particle size distribution of the eight treatments. The freeze-dried microparticles showed the greatest diameter (104.3 to 684.9 µm) while a smaller diameter (4.8 to 14.3 µm) was observed for the spray-dried microparticles.

According to Man et al. (1999), the particle diameter of the spray-dried product ranges from 1-15 μm , which can reach 300 μm in freeze-dried products. The freeze-dried microparticles with PHGG showed particle size above 300 μm , which was higher than the microparticles with GA. The largest particle size of the freeze-dried samples is due to the low process temperature, and the lack of strength to break the frozen drops or to alter the surface during drying (Chen, Chi & Xu, 2012). In addition, the process used to reduce the particle size, which was manually done with a mortar and pestle may have affected the particle size of the microparticles.

It can also be seen that all treatments with PD had larger particle size when compared to the treatments without PD. For both spray-dried as freeze-dried treatments, the lowest diameter was found for the samples encapsulated only with GA. According to Masters (1991), in spray drying the particle size is associated to the viscosity of the wall material, once the higher the viscosity, the greater the particle size is. Furthermore, the presence of larger particles can be due to the beginning of agglomeration process, since the formation of irreversible bridges leads to formation of larger particles (Tonon et al., 2008). Ezhilarasi et al. (2013) also observed that the use of different wall materials significantly affected the particle size of Garcinia extract encapsulated by freeze-drying.

The span values are related to particle size distribution, with lower values indicating a more homogeneous distribution (Fernandes et al., 2014), which are desirable. The smallest span values were observed for the spray-dried treatment with GA and the spray-dried treatment with 10% PHGG, with span values below 2. Lower diameters were also observed for these treatments.

With respect to the particles morphology, the spray-dried microparticles (Fig 2A, 2B, 2E, and 2F) exhibited spherical structures with different sizes, without fissures or cracks, which are characteristics of microparticles produced by this drying method (Ferrari et al., 2012).

The spray-dried powders with GA presented concavities and rough surface, which was also observed by other authors (Bhusari et al., 2014; Ferrari et al., 2012). The concavities are formed due to the rapid water evaporation in the spray drying process, and consequent contraction or shrinkage of the particles (Rosenberg, Kopelman & Talmon 1985). Bhusari et al (2014) suggest that the concavities in the microparticles with GA are due to the protein fraction in the molecule. The particles

produced with PHGG were more spherical, having fewer concavities when compared to those produced with GA.

The attempt to produce powders using only PD as wall material did not show positive results, as no powder was obtained. This may be due to the PD can undergo depolymerization when subjected to high temperatures and low pH, releasing glucose molecules (Craig, Anderson, Holden & Murray, 1996), which can increase the hygroscopicity and adhesiveness of the powder in the drying chamber, thus PD should be used in combination with other encapsulating agents. On the other hand, a reduction in the number of concavities was observed in the treatments using PD, GA, and PHGG as encapsulating agents. The formation of concavities or shrinkage can also be related to the size of the encapsulating agent molecule, since a larger chain can impede the passage of water molecules (Bhusari et al., 2014). . It is known that among the three encapsulating agents used, the PD has the lowest molecular weight, followed by PHGG and GA (Al-Assaf et al., 2005; Kapoor et al., 2009; Mitchell, 1996)

The spray-dried treatments with 5% PHGG and 5% PD showed the best microstructure (Fig. 2E), with more spherical particles, and few concavities and roughness. Microcapsules with very porous surfaces, rough, or cracked have poor flowing properties (Rosenberg et al., 1985), in addition to having greater contact surface, which can make the materials more susceptible to degradation reactions.

The freeze-dried microparticles (Figure 2C, 2D, 2G, and 2H) exhibited a completely different structure when compared with the spray-dried particles. Structural characteristics of freeze-dried materials, irregularly shaped, like broken glass and various sizes were observed (Khazaei, et al., 2014; Man et al., 1999). According to Aguilera and Stanley (1999), the structural rigidity provided by the frozen surface where the sublimation takes place, and the lack of water in the liquid state results in a porous structure with no shrinkage, which is the primary quality factor of freeze-dried foods.

An aggregation of the microparticles was observed in the treatment with PD, probably due to the tendency of polydextrose to bind water and form bridges between molecules. This corroborates the results of a_w , since the freeze-dried samples with PD showed slightly higher a_w values than the samples subjected to the same treatment, but without PD.

4. Conclusions

It was possible to encapsulate Bordo grape phenolic extract using gum Arabic, partially hydrolyzed guar gum, and polydextrose as encapsulating agents, obtaining powders with retention of phenolics and anthocyanins greater than 80%. In addition, high antioxidant activities were also observed, representing a potential dye for use in functional foods. In general, spray-dried powders had better physical characteristics when compared to freeze-dried powders. Considering the set of results, the spray-dried treatment with 5% PHGG and 5% PD presented the best behavior due to the better retention of phenolic compounds, anthocyanins, and antioxidant activity by DPPH and CUPRAC assays. Furthermore, as observed for the other spray-dried treatments, lower moisture content, a_w , and particle size, higher T_g and solubility, and lower hygroscopicity values were observed among the spray-dried treatments. It presented the best morphological characteristics with spherical microparticles, and lower incidence of roughness and concavities. The application of these microparticles in food has been investigated.

Acknowledgements

We would like to thank, CAPES, CNPq, FAPERGS and the Laboratório de Materiais Cerâmicos (UFRGS), principally, Dra Annelise Kopp Alves and Patrícia Cavalcante Justino to help with particle size analysis.

References

- Adhikari, B., Howes, T., Bhandari, B. R., & Troung, V. (2004). Effect of addition of maltodextrin on drying kinetics and stickiness of sugar and acid-rich during convective drying: experiments and modelling. *Journal of Food Engineering*, 62, 53-68.
- Aguilera, J. M., & Lillford, P. J. (2008). Structure-property relationships in foods. In: J. M. Aguilera, & P. J. Lillford (Eds.), *Food material science: Principle and practice*. NY, USA: Springer Science & Business Media.
- Aguilera, J. M., & Stanley, D. W. (1999). *Microstructural principles of food processing and engineering*. (2nd ed.). USA: Aspen (Chapter 2, 9).
- Al-Assaf, S., Philips, G. O., & Williams, P. A. (2005). Studies on Acacia exudates gums: part II. Molecular weight comparison of the Vulgares and Gummiferae series of Acacia gums. *Food Hydrocolloids*, 19, 661-667.

- AOAC (1990). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproin: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 7970-7981.
- Bhusari, S. N., Muzaffar, K., & Kumar, P. (2014). Effect of carrier agents on physical and microstructural properties of spray dried tamarind pulp powder. *Powder Technology*, *266*, 354-364.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, *28*, 25-30.
- Burin, V. M., Rossa, P. N., Ferreira-Lima, N. E., Hillmann, M. C. R., & Bordignon-Luiz, M. T. (2011). Anthocyanins: optimization of extraction from Cabernet Sauvignon grapes, microencapsulation and stability in soft drink. *International Journal of Food Science & Technology*, *46*, 186-193.
- 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 and Emerging Technologies*, *6*, 420-428.
- Caparino, O. A., Tang, J., Nindo, C. I., Sablani, S. S., Powers, J. R. & Fellman, J. K. (2012). Effect of drying methods on the physical properties and microstructures of mango (Philippine 'Carabao' var.) powder. *Journal of Food Engineering*, *111*, 135-148.
- Chen, C., Chi, Y. J., & Xu, W. (2012). Comparisons on the functional properties and antioxidant activity of spray-dried and freeze-dried egg white protein hydrolysate. *Food Bioprocess Technology*, *5*, 2342-2352.
- Craig, S.A.S., Anderson, J. M., Holden, J. F., & Murray, P. R (1996). Bulking agents: polydextrose. In H. van Bakkum, H. Röpper, & A. G. J. Voragen (Eds.), *Carbohydrates as Organic Raw Materials III* (pp.217-230). New York: VHC.
- Ezhilarasi, P. N., Indrani, D., Jena, B. S., & Anandharamakrishnan, C. (2013). Freeze drying technique for microencapsulation of *Garcinia* fruit extract and its effect on Bread quality. *Journal of Food Engineering*, *117*, 513-520.

- Fang, Z., & Bhandari, B. (2011). Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*, *129*, 1139-1147.
- Fernandes, R. V. B., Borges, S. V., & Botrel, D. A. (2014). Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of Rosemary essential oil. *Carbohydrate Polymers*, *101*, 524-532.
- Ferrari, C. C., Germer, S. P. M., Alvim, I. D., Vissotto, F. Z., & Aguirre, J. M. (2012). Influence of carrier agents on the physicochemical properties of blackberry powder produced by spray drying. *International Journal of Food Science & Technology*, *47*, 1237-1245.
- Golde, P. H. van, Westelaken, M. van der, Bouma, B. N. & Wiel, A. van de. (2004). Characteristics of piraltin, a polyphenol concentrate, produced by freeze-drying of red wine. *Life Sciences*, *74*, 1159–1166.
- 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.
- Kapoor, M. P., & Juneja, L. R. (2009). Partially Hydrolyzed Guar Gum Dietary Fiber. In Cho, S. S., & Samuel, P. (Eds.), *Fiber Ingredients: Food Applications and Health Benefits* (pp. 70-120). Boca Raton: CRC Press.
- Khazaei, K. M., Jafari, S. M., Ghorbani, M., & Kakhki, A. H. (2014). Application of maltodextrin and gum Arabic in microencapsulation of saffron petal's anthocyanins and evaluating their storage stability and color. *Carbohydrate Polymers*, *105*, 57-62.
- Lago-Vanzela, E. S., Da-Silva, R., Gomes, E., García-Romero, E., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2011). Phenolic Composition of the Edible Parts (Flesh and Skin) of Bordô Grape (*Vitis labrusca*) Using HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 13136-13146.
- Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, *88*(5), 1269-1278.
- Man, Y. B. C., Irwandi, J., & Abdullah, W. J. W. (1999). Effect of different types of maltodextrin and drying methods on physico-chemical and sensory properties of encapsulated durian flavor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *79*, 1075-1080.

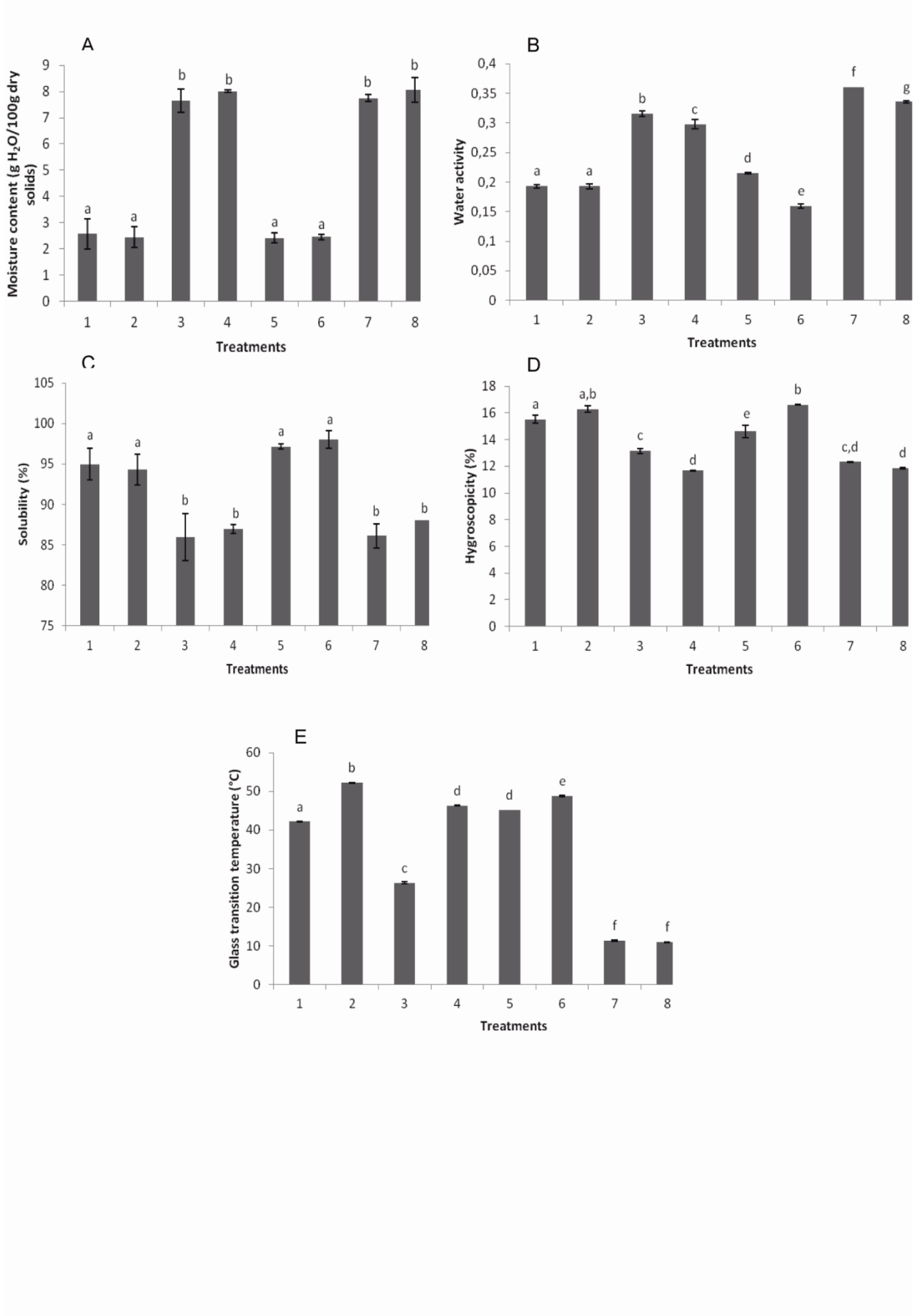
- Masters, K. (1991). *Spray Drying Handbook*. (5th ed.). London: Longman Scientific and Technical.
- Mathiowitz, E., Kreitz, M. R., & Brannon-Peppas, L. (1999). Microencapsulation. In Mathiowitz, E. (Ed.), *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery* (pp. 493-553). New York: John Wiley and Sons.
- Meng, J. F., Fang, Y. L., Qin, M. Y., Zhuang, X. F., & Zhang, Z. W. (2012). Varietal differences among the phenolic profiles and antioxidant properties of flour cultivars of spine grape (*Vitis davidii* Foex) in Chongyi (China). *Food Chemistry*, *134*, 2049-2056.
- Mitchell, H. L. (1996). The role of the bulking agent polydextrose in fat replacement. In S. Roller, & S. A. Jones. (Eds.), *Handbook of Fat Replacers* (pp. 235-249). Boca Raton: CRC Press.
- Ramírez, M. J., Giraldo, G. I., & Orrego, C. E. (2015). Modeling and stability of polyphenol in spray-dried and freeze-dried fruit encapsulates. *Powder Technology*, *277*, 89-96.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, *2*(4), 152-159.
- Rodrigo, R., Miranda, A., & Vergara, L. (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*, *412*, 410-424.
- Rosenberg, M., Kopelman, I. J., & Talmon, Y. (1985). A scanning electron microscopy study of microencapsulation. *Journal of Food Science*, *50*, 139-144.
- Silva, P. I., Stringheta, P. C., Teófilo, R. F., & Oliveira, I. R. N. (2013). Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaborcaba (*Myrciaria jaborcaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *Journal of Food Engineering*, *117*, 538-544.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*, 144-158.
- Souza, V. B., Thomazini, M., Balieiro, J. C. 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*, 39-50.

- Toaldo, I. M., Fogolari, O., Pimentel, G. C., Gois, J. S., Borges, D. L. G., Caliari, V., & Bordignon-Luiz, M. (2013). Effect of grape seeds on the polyphenol bioactive content and elemental composition by ICP-MS of grape juices from *Vitis labrusca* L., *LWT – Food Science and Technology*, 53, 1-8.
- Tonon, R. 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, 411-418.
- Tonon, R. V., Brabet, C., Pallet, D., Brat, P., & Hubinger, M. D. (2009). Physicochemical and morphological characterization of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1950-1958.
- Zheng, L., Ding, Z., Zhang, M., & Sun, J. (2011). Effect of industrial juice concentrate processing on phenolic profile and antioxidant capacity of black carrots. *Journal of Food Engineering*, 104, 89-95.

Figure captions

Fig. 1. Physical properties of grape skin aqueous extract microencapsulated with gum Arabic (GA), partially hydrolyzed guar gum (PHGG), and polydextrose (PD) by spray-drying and freeze-drying. Treatment 1: spray-dried, with 5% GA and 5% PD; Treatment 2: spray-dried, with 10% GA; Treatment 3: freeze-dried, with 5% GA and 5% PD; Treatment 4: freeze-dried, with 10% GA; Treatment 5: spray-dried, with 5% PHGG and 5% PD; Treatment 6: spray-dried, with 10% PHGG; Treatment 7: freeze-dried, with 5% PHGG and 5% PD; and Treatment 8: freeze-dried, with 10% PHGG.

Fig. 2. Micrographs of grape skin aqueous extract microencapsulated with gum Arabic (GA), partially hydrolyzed guar gum (PHGG), and polydextrose (PD) by spray-drying and freeze-drying. A: treatment 1 (spray-dried, with 5% GA and 5% PD); B: Treatment 2 (spray-dried, with 10% GA); C: Treatment 3 (freeze-dried, with 5% GA and 5% PD); D: Treatment 4 (freeze-dried, with 10% GA); E: Treatment 5 (spray-dried, with 5% PHGG and 5% PD); F: Treatment 6 (spray-dried, with 10% PHGG); G: Treatment 7 (freeze-dried, with 5% PHGG and 5% PD) and H: Treatment 8 (freeze-dried, with 10% PHGG).



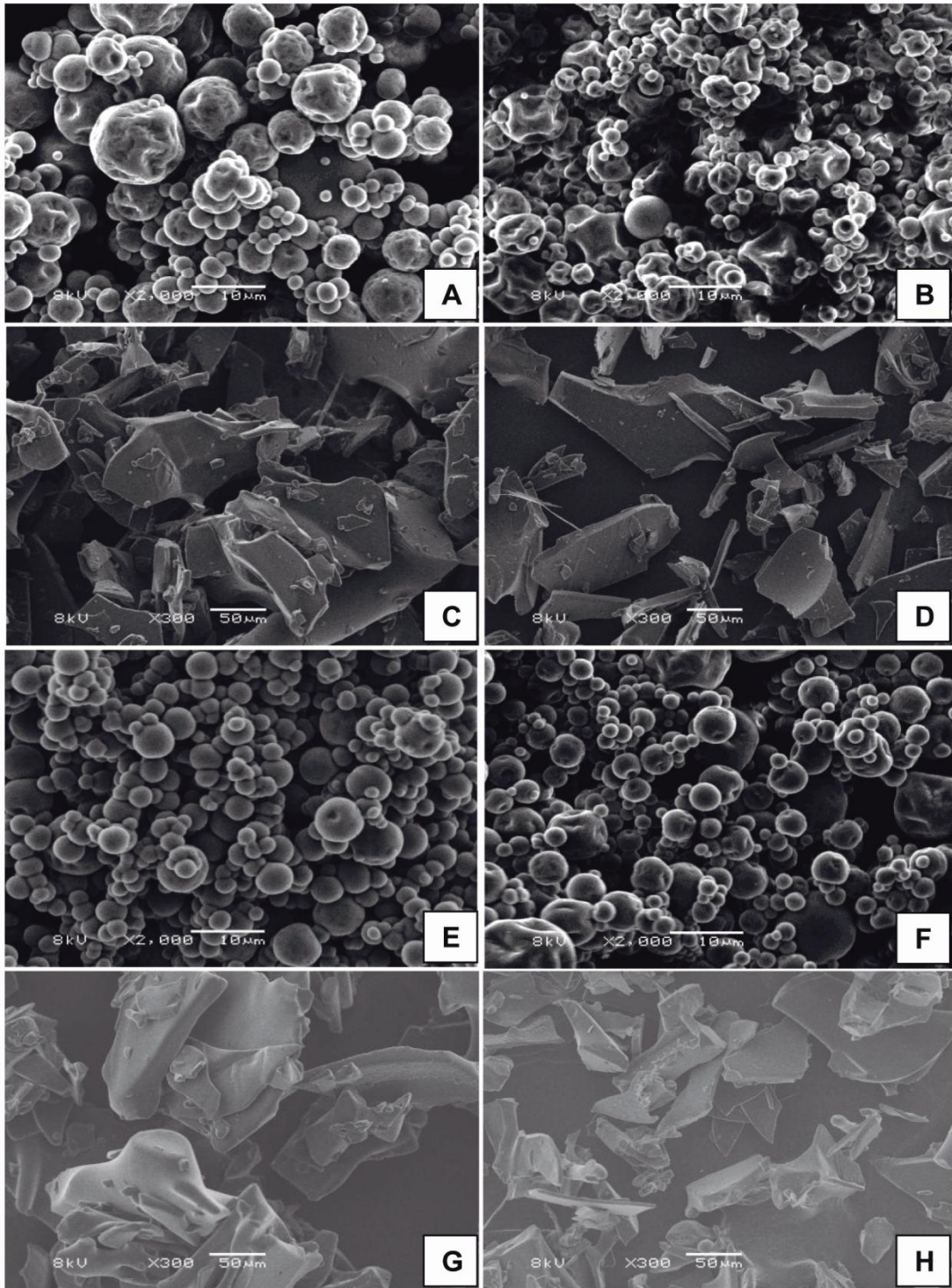


Table 1. Total phenolics (TPC), Total anthocyanins (ACN), and antioxidant activity (by DPPH, CUPRAC and HRSA) of the grape skin aqueous extract microencapsulated with gum Arabic (GA), partially hydrolyzed guar gum (PHGG), and polydextrose (PD) by spray drying and freeze-drying.

Treatments	TPC*	ACN**	DPPH***	CUPRAC***	HRSA (%)
Extract	26.26±0.12 ^a	21.15±1.06 ^a	128.12±4.47 ^a	181.10±2.70 ^a	66.98±0.18
1	23.59±0.17 ^b	17.18±0.17 ^b	69.47±1.68 ^{b,c}	143.41±3.00 ^b	78.94±0.24 ^a
2	25.03±0.07 ^c	18.41±1.02 ^b	60.13±2.06 ^{d,e}	151.62±1.49 ^c	79.64±0.24 ^a
3	24.57±0.05 ^c	18.38±0.28 ^b	75.72±0.56 ^f	141.75±1.21 ^b	84.67±0.17 ^b
4	22.61±0.07 ^{d,e}	17.27±0.40 ^b	58.20±1.86 ^e	132.93±4.14 ^d	73.50±0.75 ^c
5	23.39±0.16 ^{c,d}	21.05±0.08 ^a	73.42±2.38 ^{b,f}	150.73±0.58 ^c	82.86±0.20 ^{d,e}
6	21.43±0.04 ^f	20.84±0.15 ^a	65.48±1.20 ^{c,d}	133.52±0.96 ^d	84.40±0.61 ^b
7	21.37±0.09 ^f	17.07±0.10 ^b	58.26±1.04 ^e	132.43±0.99 ^d	83.94±0.40 ^{b,d}
8	21.89±0.15 ^{e,f}	18.25±0.28 ^b	50.82±1.81 ^g	140.57±0.93 ^b	82.20±0.23 ^e

Different letters within the same column indicate significant differences ($p < 0.05$). * Results expressed as mg GAE / g sample on dry basis, ** mg malvidin-3,5-di glucoside / g sample on dry basis, TE *** μmol / g sample on dry basis. The weight of the encapsulating agents was discounted. Treatment 1: spray-dried, with 5% GA and 5% PD; Treatment 2: spray-dried, with 10% GA; Treatment 3: freeze-dried, with 5% GA and 5% PD; Treatment 4: freeze-dried, with 10% GA; Treatment 5: spray-dried, with 5% PHGG and 5% PD; Treatment 6: spray-dried, with 10% PHGG; Treatment 7: freeze-dried, with 5% PHGG and 5% PD; and Treatment 8: freeze-dried, with 10% PHGG.

Table 2. Color parameters (L^* , a^* , b^* , Hue angle, and Chroma) of the grape skin aqueous extract microencapsulated with gum Arabic (GA), partially hydrolyzed guar gum (PHGG), and polydextrose (PD) by spray drying and freeze drying.a

Treatments	L^*	a^*	b^*	Hue (°)	Chroma
1	38.06±0.60 ^a	46.28±0.23 ^a	-7.42±0.13 ^a	350.89±0.11 ^a	46.87±0.24 ^{a,b}
2	40.17±0.21 ^b	46.29±0.05 ^a	-9.57±0.02 ^b	348.34±0.04 ^b	47.27±0.04 ^a
3	22.46±0.13 ^c	27.11±0.13 ^b	-0.44±0.07 ^c	359.06±0.14 ^c	27,11±0,13 ^c
4	22.28±0.12 ^{c,d}	28.36±0.11 ^c	-2.44±0.02 ^d	355.08±0.02 ^d	28.47±0.11 ^d
5	37.89±1.11 ^a	46.03±0.11 ^a	-5.91±0.02 ^e	352.68±0.02 ^e	46.41±0.11 ^b
6	40.33±0.14 ^b	46.22±0.12 ^a	-6.33±0.06 ^f	352.20±0.06 ^f	46.66±0.12 ^b
7	20.63±0.44 ^d	25.36±0.24 ^d	-1.02±0.02 ^g	357.70±0.03 ^g	25.38±0.24 ^e
8	22.60±0.15 ^{c,d}	29.08±0.24 ^e	-0.46±0.05 ^c	359.10±0.09 ^c	29.08±0.24 ^f

Different letters in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$). Treatment 1: spray-dried, with 5% GA and 5% PD; Treatment 2: spray-dried, with 10% GA; Treatment 3: freeze-dried, with 5% GA and 5% PD; Treatment 4: freeze-dried, with 10% GA; Treatment 5: spray-dried, with 5% PHGG and 5% PD; Treatment 6: spray-dried, with 10% PHGG; Treatment 7: freeze-dried, with 5% PHGG and 5% PD; and Treatment 8: freeze-dried, with 10% PHGG.

Table 3. Average diameter and particle size distribution (Span) of the grape skin aqueous extract microencapsulated with gum Arabic (GA), partially hydrolyzed guar gum (PHGG), and polydextrose (PD) by spray-drying and freeze-drying.

Treatments	Average diameter [D(4,3)] (μm)	Span
1	8.35	1.91
2	4.82	1.98
3	123.39	3.60
4	104.30	2.79
5	14.25	2.26
6	8.48	1.94
7	684.85	3.32
8	485.12	5.99

Treatment 1: spray-dried, with 5% GA and 5% PD; Treatment 2: spray-dried, with 10% GA; Treatment 3: freeze-dried, with 5% GA and 5% PD; Treatment 4: freeze-dried, with 10% GA; Treatment 5: spray-dried, with 5% PHGG and 5% PD; Treatment 6: spray-dried, with 10% PHGG; Treatment 7: freeze-dried, with 5% PHGG and 5% PD; and Treatment 8: freeze-dried, with 10% PHGG.

CAPÍTULO 4

Estabilidade de micropartículas obtidas a partir de extrato fenólico de casca de uva Bordô (*Vitis labrusca* L.) utilizando povidexrose e goma guar parcialmente hidrolisada como materiais de parede

Luiza Siede Kuck^{a,*}, Caciano Pelayo Zapata Noreña^a

^aLaboratório de Engenharia de Processos em Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43.212, Campus do Vale, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43.212, Campus do Vale, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil Tel.: +55 051 3308 7791; fax: +55 051 3308 7048.

E-mail address: luizakuck@yahoo.com.br (L. S. Kuck).

Artigo a ser traduzido e submetido para publicação na revista Food Chemistry.

Resumo

A estabilidade de micropartículas de extrato aquoso de casca de uva Bordô elaboradas por atomização e liofilização utilizando povidona (5%) e goma guar parcialmente hidrolisada (5%) foi avaliada através de condições aceleradas (75 e 90% de umidade relativa e 35, 45 e 55 °C por 35 dias) e simulação da digestão gastrointestinal. A temperatura teve um efeito significativo na diminuição no conteúdo de fenóis, com retenções de 82,5% a 93,5%. Na perda das antocianinas monoméricas totais foi significativo o efeito da temperatura, umidade relativa e tempo, com retenções de 3,9 a 42,3%. A redução do teor de antocianinas monoméricas totais exibiu cinética de primeira ordem, e os parâmetros termodinâmicos indicaram que a reação foi endotérmica e não espontânea. A atividade antioxidante teve comportamento similar ao dos fenóis totais, com retenção final de 38,5 a 59,5%. Na simulação da digestão gastrointestinal os fenóis apresentaram liberação máxima na fase intestinal (90,6% atomizado e 94,9% liofilizado), assim como a atividade antioxidante (69,4% atomizado e 67,8% liofilizado). Entretanto, antocianinas monoméricas tiveram redução do seu conteúdo na fase intestinal. O método de secagem utilizado não influenciou na estabilidade das micropartículas.

Palavras-chave: atomização. liofilização. antocianinas monoméricas totais. atividade antioxidante. simulação da digestão gastrointestinal.

1. Introdução

A uva Bordô é uma das variedades de *Vitis labrusca* L. mais importantes e mais cultivadas no Brasil, e é caracterizada, principalmente, pela sua coloração vermelho-púrpura intensa, resultado do seu elevado conteúdo de polifenóis, principalmente antocianinas (Barnabé, Filho & Bolini, 2007; Lago-Vanzela, Da-Silva, Gomes, García-Romero & Hermosín-Gutiérrez, 2011). Os compostos fenólicos possuem atividade antioxidante, cuja função é a de neutralizar e prevenir a formação de radicais livres (Rice-Evans, Miller & Paganga, 1997), resultando em efeitos benéficos à saúde, tais como capacidade cardioprotetora, anti-cancer, anti-diabetes, anti-microbiana, anti-inflamatória, além de agirem contra doenças neurodegenerativas, doenças nos rins e envelhecimento (Rodrigo, Miranda & Vergara, 2011).

Entretanto, os polifenóis são instáveis a diversas condições presentes no processamento e armazenamento de alimentos, tais como as altas temperaturas, presença de enzimas oxidativas, luz e oxigênio e mudanças de pH (Fang & Bhandari, 2011). A microencapsulação tem como principal objetivo aumentar a vida útil dos produtos, criando uma barreira entre os componentes encapsulados e o meio (Jiménez-Aguilar, Ortega-Regules, Lozada-Ramírez, Pérez-Pérez, Vernon-Carter & Welti-Chanes, 2011; Kandansamy & Somasundaram, 2012). Existem diversos métodos de microencapsulamento, dentre os quais, alguns envolvem a secagem do alimento, tais como a atomização e a liofilização. A retirada da água promovida por estes processos torna mais fácil e prático o uso do alimento, além de colaborar com o aumento da estabilidade, e de facilitar e reduzir o custo do transporte e do armazenamento, através da redução do volume (Moraga, Igual, García-Martínez, Mosquera & Martínez-Navarrete, 2012) e peso.

Vários tipos de compostos podem ser utilizados como materiais de parede na encapsulação, entretanto, devem ser observadas algumas características do material, como a sua capacidade de formar filme, resistência ao trato gastrointestinal, viscosidade, conteúdo de sólidos, higroscopicidade e custo (Silva, Stringheta, Teófilo & Oliveira, 2013). A goma guar parcialmente hidrolisada e a povidexose, são carboidratos altamente solúveis em água com baixa viscosidade, prebióticas e potenciais agentes encapsulantes pouco estudadas na encapsulação de compostos alimentícios.

A estabilidade e a estimativa de vida útil são aspectos importantes a serem considerados na utilização desses pigmentos como corantes ou antioxidantes em alimentos (Pitalua, Jiménez, Vernón-Carter & Beristain, 2010). Porém, existem produtos com vida útil longa que tornam difícil a sua determinação experimental (Breda, Sanjinez-Argandoña & Correia, 2012). Para estes alimentos podem ser feitos o uso de testes acelerados, em que o produto é submetido a condições extremas de armazenamento, onde um ou mais fatores de aceleração (como, por exemplo, temperatura, umidade relativa, atividade de água) são mantidos em níveis mais elevados em relação a condições normais de armazenamento, de forma que a velocidade de degradação seja aumentada, resultando em um tempo de vida mais curto, facilitando assim a realização dos experimentos (Richards, Kock & Buys, 2014) para a estimativa de sua estabilidade.

Também é importante compreender como o processo de digestão afeta a estabilidade e biodisponibilidade destes compostos, visto que os polifenóis são ingeridos na dieta na forma de dispersões complexas, imersas em uma matriz alimentar (Bermúdez-Soto, Tomás-Barberán & García-Conesa, 2007). Sendo assim, testes *in vitro* podem ser feitos a fim de verificar a estabilidade de um produto em condições simuladas do trato gastrointestinal. A biodisponibilidade de um composto está relacionada com sua estabilidade digestiva, sua liberação da matriz alimentar e a eficiência de sua passagem transepitelial (Tagliazucchi, Verzellon, Bertolini & Conte, 2010).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade em condições aceleradas de armazenamento e também em condições simuladas da digestão gastrointestinal de micropartículas obtidas a partir do extrato aquoso acidificado de casca de uva Bordô por atomização e liofilização utilizando povidona e goma guar parcialmente hidrolisada como materiais de parede.

2. Material e métodos

As uvas foram obtidas diretamente com o produtor na cidade de Cotiporã, Rio Grande do Sul, Brasil. Os cachos foram selecionados, lavados com água, embalados em sacos de polietileno e armazenados a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da utilização. Os agentes encapsulantes utilizados foram: povidona (MasterSense Ing. Alim. Ltda., Brasil) e goma guar parcialmente hidrolisada (Sunfiber R, R&S Blumos, Com. Prod. Alimentícios Ltda., Brasil). ABTS* (2,2'-azino-bis 3-etilbenzeno-tiazolidina-6-ácido sulfônico), Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico), Ácido Gálico, Mucina, α -Amilase, Pepsina, Pancreatina, Lipase e Sais de Bile foram obtidos da Sigma-Aldrich. Os demais reagentes utilizados foram reagentes de grau analítico.

2.1. Elaboração das micropartículas

As uvas foram descongeladas, branqueadas em água a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos, e resfriadas em banho de gelo por 3 minutos. Após separação da polpa e sementes, foi realizada a obtenção do extrato fenólico da casca, utilizando água acidificada com ácido cítrico (2%, m/v). As cascas foram misturadas ao solvente na proporção de 1:3 (m/v), e esta mistura foi triturada e mantida no escuro por 20 horas em

temperatura ambiente. Após este período, o extrato foi filtrado a vácuo com papel filtro Whatman nº01, para a separação dos resíduos sólidos.

Os dois tratamentos utilizados neste estudo foram escolhidos de acordo com os melhores resultados obtidos em trabalho anterior (Kuck e Noreña, 2016), onde o melhor tratamento observado foi o pó atomizado com 5% de polidextrose e 5% de goma guar parcialmente hidrolisada. Dessa forma utilizou-se este tratamento e seu similar liofilizado para avaliação da estabilidade.

Para isso, foi elaborada uma dispersão a partir do extrato, adicionando-se 5% (m/v) de polidextrose e 5% (m/v) de goma guar parcialmente hidrolisada. A dispersão foi obtida com auxílio de Ultra-Turrax (T25, Ika), a 6500 rpm por 5 minutos.

A encapsulação por atomização foi realizada em atomizador de duplo fluido, do tipo pneumático (Mini-Spray-Dryer LM MSDi 1.0, LABMAQ), com bico de alimentação de 1.0 mm de diâmetro. A alimentação do secador foi realizada através de uma bomba peristáltica com vazão de 0,60 L/h, a temperatura do ar de secagem foi de 140 °C, a pressão de ar comprimido 3,5 Kgf/cm² e a vazão de ar de atomização 40,5 L/h.

Para a liofilização, após dispersão dos encapsulantes, as amostras foram congeladas em ultrafreezer (Liotop UFR 30, Liobras) a -68 °C por 24 horas. A seguir as amostras foram acondicionadas em um liofilizador (Liotop L101, Liobras) e secas empregando temperatura de -57 °C e pressão de vácuo menor que 200 µHg por 48 horas. Após secagem, as amostras foram trituradas, utilizando gral e pistilo.

Foram determinados o conteúdo de fenóis e antocianinas monoméricas totais, e a atividade antioxidante por ABTS[•] das duas amostras. Não foi possível a elaboração de uma amostra controle, sem a presença de material de parede, por atomização ou liofilização, devido à característica extremamente gomosa do extrato desidratado.

2.2. Análises químicas

O conteúdo de fenóis totais (TPC) foi determinado utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). As leituras foram feitas em espectrofotômetro (Genesys S10, Thermo Scientific) a 765 nm. Os resultados foram expressos em mg de Ácido Gálico equivalente (GAE) por g de amostra em base seca.

O conteúdo de antocianinas monoméricas totais (TMAC) foi determinado conforme metodologia de Lee, Durst e Wrolstad (2005). O extrato e os pós diluídos

foram misturados aos tampões pH 1,0 e 4,5. As leituras das absorvâncias foram feitas em espectrofotômetro a 520 e 700 nm. Os resultados foram expressos em mg de malvidina-3,5-diglicosídeo (Mvd-3-5-diglu) por g de amostra em base seca, utilizando absorvância molar 37000 L/cm/mol e massa molar 724,5 g/mol (Toaldo et al., 2013).

A atividade antioxidante por ABTS^{*} foi determinada de acordo com Re et al. (1999) com modificações. Para a determinação, 1 mL da solução estoque de ABTS^{*} (7 mM) foi misturada com 88 µL de persulfato de potássio (140 mM) 16 horas antes da análise. A solução de ABTS^{*} foi diluída em álcool etílico e sua absorvância ajustada entre 0,680 e 0,720. Para determinação da atividade antioxidante, 30 µL de amostra foi misturado a 3 mL da solução de ABTS^{*}, e após 6 minutos, a leitura foi feita em espectrofotômetro em absorvância de 734 nm. Os resultados foram expressos em µmol de Trolox equivalente (TE) por g de amostra em base seca.

Todas as análises foram feitas em triplicata.

2.3. Microscopia eletrônica de varredura

As estruturas das partículas foram avaliadas por microscópio eletrônico de varredura (JSM 6060, JEOL Ltda). As amostras foram fixadas em *stubs* utilizando fita adesiva dupla face de carbono, metalizadas utilizando carbono, e após, examinadas no microscópio, operando a uma tensão de 8kV e ampliação de $\times 100$ para os pós liofilizados e $\times 1000$ para os pós atomizados.

2.4. Testes acelerados de estabilidade de armazenamento

Para avaliação da estabilidade dos pós microencapsulados, 0,5 g de pó de cada tratamento foram colocados tubos criogênicos de 2 mL, sem tampa, cobertos com Parafilm® perfurado. As condições utilizadas no estudo foram: 75% e 90% de umidade relativa nas temperaturas de 35, 45 e 55 °C.

As condições de umidade relativa foram reproduzidas acondicionando as amostras em dessecadores contendo soluções saturadas de cloreto de sódio (75%) e cloreto de bário (90%). Os dessecadores foram acondicionados em incubadora (411/FDP, Ethik Technology) à temperatura constante (35 °C, 45 °C e 55 °C) por 35 dias. Os experimentos foram conduzidos em duplicata. As análises de fenóis totais, antocianinas monoméricas totais e atividade antioxidante por ABTS^{*} foram realizadas a cada 7 dias.

2.4.1. Determinação dos parâmetros cinéticos

Para ajustar os dados experimentais do teor de antocianinas monoméricas totais durante o armazenamento, foi utilizado o modelo cinético de primeira ordem (Stamp & Labuza, 1983), de acordo com a equação (1):

$$C=C_0 \exp(-kt) \quad (1)$$

onde: C representa o conteúdo residual de antocianinas no tempo t , C_0 o conteúdo inicial de antocianinas, k é a constante de velocidade (dias^{-1}) e t é o tempo (dias).

Os tempos de redução decimal (D) e de meia vida ($t_{1/2}$), que indicam o tempo necessário para que ocorra 90% e 50% de degradação, respectivamente, foram calculados de acordo com as equações (2) e (3):

$$D = \frac{\ln(10)}{k} \quad (2)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \quad (3)$$

A partir dos valores de k , a equação de Arrhenius (4) foi utilizada para descrever a dependência da temperatura na constante de velocidade e para estimar a energia de ativação (E_a)

$$k = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (4)$$

onde: A é a constante de Arrhenius (dias^{-1}), E_a a energia de ativação (kJ/mol), R a constante universal dos gases ($8,314 \text{ kJ/kmol/K}$) e T a temperatura (K).

A energia de ativação foi obtida da equação (5):

$$\ln(K) = \ln(A) - \frac{E_a}{RT} \quad (5)$$

O coeficiente de resistência térmica (z), que é a temperatura necessária para variar o valor de D em uma unidade logarítmica, foi obtido através da plotagem dos valores de D em uma escala logarítmica *versus* suas temperaturas correspondentes.

O parâmetro Q_{10} é definido como o número de vezes que uma taxa de reação muda com o aumento de 10 °C na temperatura e foi calculado de acordo com a equação (6):

$$Q_{10} = \left(\frac{k_{T+10}}{k_T} \right) \quad (6)$$

2.4.2 Determinação dos parâmetros termodinâmicos

Os valores das constantes de degradação e energia de ativação foram utilizados para a determinação dos parâmetros termodinâmicos: energia livre de Gibbs (ΔG^\ddagger), entalpia (ΔH^\ddagger) e entropia (ΔS^\ddagger), de acordo com as equações (7), (8) e (9):

$$\Delta G^\ddagger = R \cdot T \cdot \ln \left(\frac{k \cdot h_p}{K_B \cdot T} \right) \quad (7)$$

$$\Delta H^\ddagger = E_a - R \cdot T \quad (8)$$

$$\Delta S^\ddagger = \left(\frac{\Delta H^\ddagger - \Delta G^\ddagger}{T} \right) \quad (9)$$

onde: K_B é a constante de Boltzmann's ($1,3806 \times 10^{-23}$ J/K) e h_p é a constante de Planck's ($6,6262 \times 10^{-34}$ J.s).

2.5. Simulação da digestão gastrointestinal

A simulação da digestão gastrointestinal (boca, estômago e intestino delgado) dos pós microencapsulados foi feita de acordo com Flores, Singh, Kerr, Pegg e Kong (2014), com algumas adaptações. As soluções simulando saliva (500 mL de água deionizada; 58,5 mg NaCl; 74,5 mg KCl; 1,05 g NaHCO₃; 0,2 g Ureia; 0,5 g Mucina; 1,0 g α -Amilase; pH 6,8); suco gástrico (500 mL de água deionizada; 2,752 g NaCl; 0,824 g KCl; 0,266 g NaH₂PO₄; 0,399 g CaCl₂•2H₂O; 0,306 g NH₄Cl; 0,085 g Ureia; 6,5 mL HCl; 2,5 g Pepsina; 3,0 g Mucina; pH 1,30); duodenal (500 mL de água deionizada; 7,012 g NaCl; 0,564 g KCl; 3,388 g NaHCO₃; 80,0 mg KH₂PO₄; 0,1 g Ureia; 0,180 mL HCl; 9,0 g Pancreatina; 1,5 g Lipase, pH 8,1); e bile (500 mL de água deionizada; 5,259 g NaCl; 0,376 g KCl; 5,785 g NaHCO₃; 0,25 g Ureia; 0,150 mL HCl; 30 g Sais de Bile, pH 8,2) foram preparadas no dia do experimento. Para a

simulação 3,5 g dos pós microencapsulados foram colocados em erlenmeyers de 125 mL e incubados em banho com agitação (Dubnoff CT-232) a 37 °C a 60 rpm. Para a simulação da digestão na boca, foram adicionados 6 mL de suco salivar que foi agitado por 5 minutos. A seguir, 12 mL de suco gástrico foram adicionados e as amostras permaneceram em agitação por mais 2 horas. Finalmente, foram adicionados aos erlenmeyers 12 mL de suco duodenal e 6 mL de suco biliar, os quais foram mantidos em agitação por mais 2 horas. Uma alíquota de 1,5 mL foi retirada a cada uma hora de experimento, que corresponde a um total de 4 horas. Estas amostras foram centrifugadas por 6238xg por 5 minutos e 20 °C e armazenadas sob congelamento (-18 °C) até o momento das análises. O experimento foi efetuado em duplicata. Foram determinados os conteúdos de fenóis e antocianinas monoméricas totais e a atividade antioxidante por ABTS[•].

O percentual de liberação dos fenóis totais ou antocianinas monoméricas totais e a atividade antioxidante dos pós microencapsulados durante a digestão foram calculadas da seguinte forma:

$$\text{Liberação (\%)} = \frac{\text{mg de TPC ou TMAC na digestão} \times 100\%}{\text{mg de TPC ou TMAC do pó microencapsulado}}$$

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \frac{\mu\text{mol TE na digestão} \times 100\%}{\mu\text{mol TE no pó microencapsulado}}$$

2.6. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos às análises estatísticas de ANOVA, às provas de comparações múltiplas de médias de Tukey, além da correlação de Pearson, utilizando o programa SAS 9.3. A estimativa dos parâmetros dos modelos cinéticos foi efetuada mediante análise de regressão não linear utilizando o programa Sigma Plot 8.0.

3. Resultados e Discussão

3.1. Morfologia das partículas

Quanto à morfologia, as micropartículas elaboradas por atomização (Fig. 1A) apresentaram estrutura esférica de diferentes tamanhos, que são características das partículas produzidas por este método de secagem (Ferrari, Germer, Alvim, Vissotto & Aguirre, 2012), sem presença de fissuras ou rachaduras. Este tipo de estrutura é

desejável, visto que micropartículas com superfícies muito porosas, rugosas ou com fissuras possuem propriedades de escoamento ruins (Rosenberg, Kopelman & Talmon, 1985), além de apresentarem maior superfície de contato, podendo tornar os materiais mais suscetíveis a reações degradativas.

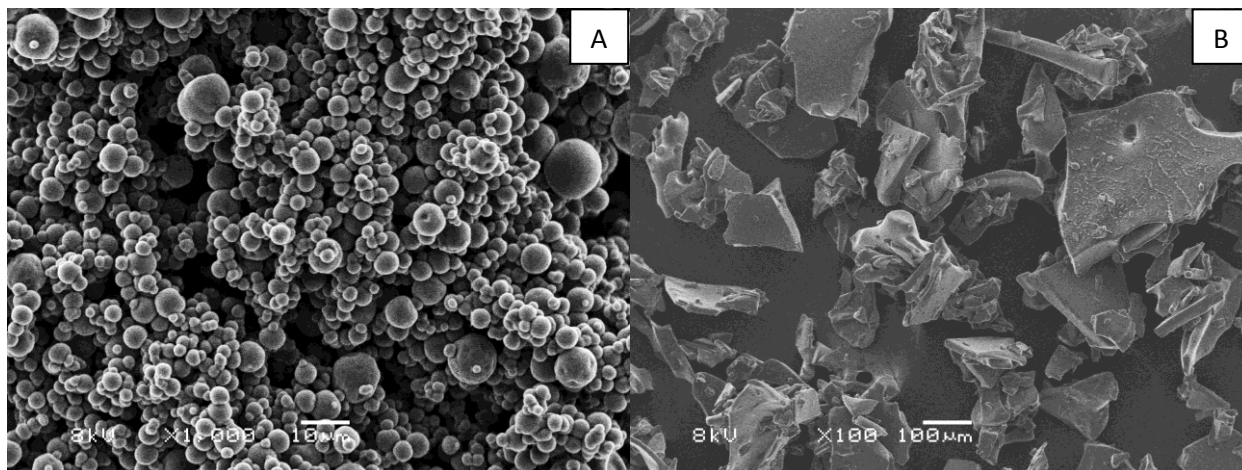


Fig. 1. Micrografias das micropartículas elaboradas a partir de extrato aquoso de casca de uva Bordô utilizando 5% de povidona e 5% de goma guar parcialmente hidrolisada como material de parede, por atomização (A) e liofilização (B).

As micropartículas elaboradas pelo processo de liofilização (Fig. 1B) apresentaram estrutura de formato irregular, semelhante a vidro quebrado e de tamanhos variados, o que é característico do método (Khazaei, Jafari, Ghorbani & Kakhki, 2014; Man, Irwandi & Abdullah, 1999). De acordo com Aguilera e Stanley (1999), a rigidez estrutural proporcionada pelo material congelado na superfície onde ocorre a sublimação e a falta de água no estado líquido, resulta em um alimento de estrutura porosa e sem encolhimento, o que é o principal fator de qualidade dos alimentos liofilizados.

3.2. Testes acelerados de estabilidade de armazenamento

3.2.1. Efeito das condições armazenamento no conteúdo de fenóis totais das micropartículas

O conteúdo de fenóis totais diminuiu significativamente nos primeiros 7 dias de armazenamento para todas as condições estudadas (Fig. 2). Sabe-se que o microencapsulamento por atomização e liofilização pode resultar na formação de microcápsulas ou microesferas. As microcápsulas são partículas que possuem uma

parede bem definida protegendo o seu núcleo, entretanto, os métodos de atomização e liofilização podem resultar na formação de microesferas, que são partículas formadas por uma fase contínua de um ou mais polímeros, onde os compostos ativos se encontram dispersos (Mathiowitz, Kreitz, & Brannon-Peppas, 1999). Neste tipo de partícula, parte dos compostos podem ficar expostos ao ambiente, o que pode ter ocasionado essa maior queda dos compostos fenólicos nos primeiros 7 dias.

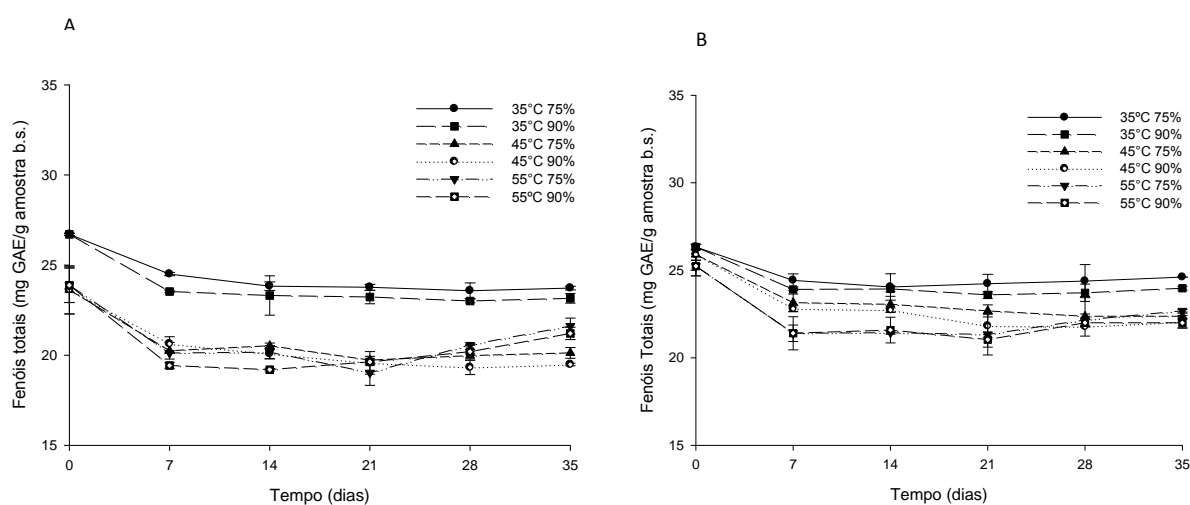


Fig. 2. Efeito da temperatura (35, 45 e 55 °C) e umidade relativa (75 e 90%) no conteúdo de fenóis totais (mg ácido gálico por g amostra em base seca) das micropartículas de extrato fenólico de casca de uva Bordô com 5% de polidextrose e 5% de goma guar parcialmente hidrolisada por atomização (A) e liofilização (B).

Após sete dias o conteúdo de polifenóis se estabilizou, não apresentando diferenças significativas com o tempo ($p > 0,05$), com exceção do pó atomizado armazenado em 55 °C, que apresentou um aumento do conteúdo após 21 dias (Tabela 1). Esses aumentos, que ocorrem em temperaturas elevadas, já foram observados em outros estudos, e estão relacionados com a habilidade que estes compostos têm de reagir uns com os outros e se hidrolisar em moléculas menores, ou se polimerizar para formação de moléculas maiores, formando compostos fenólicos de maior ou menor atividade antioxidante (Ahmad-Qasen, Ahmad-Qasen, Barrajon-Catalán, Micol, Cárcel & García-Pérez, 2016; Flores, Singh & Kong, 2014; Saénz, Tapia, Chávez & Robert, 2009).

Quando avaliado o efeito dos fatores temperatura, umidade relativa, tempo e suas interações, a ANOVA demonstrou que somente a temperatura foi significativa ($p < 0,05$). Sabe-se que os compostos fenólicos são instáveis a altas temperaturas (Henríquez, Córdova, Almonacid & Saavedra, 2014; Larrauri, Rupérez & Saura-Calixto, 1997; Turturica, Stanciuc, Bahrim & Rapeanu, 2016) exibindo significativa decomposição, que dá origem a produtos de degradação, que podem, por sua vez, ser decompostos (Hamama & Nawar, 1991). A redução do conteúdo de polifenóis durante o armazenamento pode estar relacionada com a oxidação (enzimática ou não enzimática), hidrólise e polimerização com outras moléculas (Cao, Bi, Huang, Wu, Hu & Liao, 2012; Chang, Zuo, Chow & Ho, 2006). Os fatores que influenciam essas alterações são a estrutura química dos compostos fenólicos presentes, a matriz na qual eles estão dispersos, as características físico-químicas dos pós, como a área superficial, e as condições de processamento e armazenamento ao qual o produto é submetido (Mrkic, Cocci, Dalla Rosa & Sacchetti, 2006; Sun-Waterhouse & Waterhouse, 2015), neste caso, diferentes umidades relativas e temperaturas.

As retenções variaram de 82,5% a 93,5%, sendo que os pós liofilizados tiveram retenção significativamente maiores ($p < 0,05$) do que os pós atomizados em armazenamento a 35 °C, independentemente da umidade relativa. Nas demais temperaturas não houve diferença significativa entre eles, enquanto que a umidade não teve influência sobre a retenção dos polifenóis nas micropartículas. O armazenamento em 45 °C resultou em retenções significativamente menores ($p < 0,05$) que o armazenamento em 35 °C, entretanto, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as retenções dos pós armazenados a 35 °C e a 55 °C. Isto pode ter ocorrido devido ao aumento do conteúdo de fenóis totais que foi observado em 55 °C, possivelmente decorrente das reações de hidrólise e polimerização que aumentam em temperaturas mais elevadas.

Tabela 1. Conteúdo* e retenção final de fenóis totais das micropartículas de extrato fenólico de casca de uva Bordô elaboradas por atomização e liofilização utilizando 5% de povidona e 5% de goma guar parcialmente hidrolisada como material de parede, armazenadas em condições aceleradas por 35 dias.

		0	7	14	21	28	35	Retenção 35 dias (%)
Atomizado	75% 35 °C	26,70±0,06 ^A	24,50±0,09 ^B	23,83±0,24 ^{B,C}	23,77±0,16 ^{B,C}	23,58±0,43 ^C	23,72±0,10 ^{B,C}	88,8 ^{b,c,d,e}
	75% 45 °C	23,62±1,33 ^A	20,25±0,46 ^B	20,52±0,15 ^B	19,73±0,21 ^B	19,98±0,25 ^B	20,13±0,30 ^B	85,2 ^{e,f}
	75% 55 °C	23,88±0,96 ^A	20,12±0,02 ^{B,C}	20,16±0,37 ^{B,C}	19,02±0,70 ^C	20,57±0,01 ^{B,C}	21,61±0,44 ^B	90,5 ^{a,b,c}
	90% 35 °C	26,70±0,06 ^A	23,53±0,06 ^B	23,31±1,09 ^B	23,22±0,37 ^B	23,01±0,10 ^B	23,15±0,27 ^B	86,7 ^{c,d,e}
	90% 45 °C	23,62±1,33 ^A	20,63±0,39 ^B	20,08±0,27 ^B	19,57±0,63 ^B	19,33±0,40 ^B	19,49±0,07 ^B	82,5 ^f
	90% 55 °C	23,88±0,96 ^A	19,43±0,15 ^C	19,19±0,07 ^C	19,63±0,18 ^{B,C}	20,19±0,12 ^{B,C}	21,21±0,34 ^B	88,8 ^{b,c,d,e}
Liofilizado	75% 35 °C	26,33±0,16 ^A	24,42±0,38 ^{A,B}	24,05±0,75 ^B	24,23±0,54 ^{A,B}	24,38±0,95 ^{A,B}	24,61±0,07 ^{A,B}	93,5 ^a
	75% 45 °C	25,90±0,32 ^A	23,15±0,49 ^B	23,05±0,46 ^B	22,67±0,34 ^B	22,36±1,13 ^B	22,38±0,17 ^B	86,4 ^{d,e,f}
	75% 55 °C	25,24±0,55 ^A	21,40±0,47 ^B	21,43±0,08 ^B	21,33±1,17 ^B	22,16±0,34 ^B	22,69±0,08 ^B	89,9 ^{a,b,c,d}
	90% 35 °C	26,33±0,16 ^A	23,90±0,05 ^B	23,93±0,16 ^B	23,59±0,19 ^B	23,71±0,49 ^B	23,97±0,11 ^B	91,0 ^{a,b}
	90% 45 °C	25,90±0,32 ^A	22,80±0,17 ^B	22,73±0,12 ^B	21,82±0,68 ^B	21,78±0,02 ^B	22,06±0,37 ^B	85,2 ^{e,f}
	90% 55 °C	25,24±0,55 ^A	21,41±0,55 ^B	21,58±0,73 ^B	21,03±0,43 ^B	22,00±0,20 ^B	21,99±0,28 ^B	87,12 ^{b,c,d,e}

*Conteúdo de fenóis expresso em mg de Ácido Gálico equivalente por g de amostra em base seca.
Letras maiúsculas iguais em uma mesma linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

3.2.2. Efeito das condições de armazenamento na degradação das antocianinas monoméricas totais das micropartículas

Na Figura 3, é possível observar que a temperatura, a umidade relativa e o tempo de armazenamento exerceram efeito sobre a diminuição dos teores de antocianinas monoméricas totais. A ANOVA, também indicou que os efeitos principais destes fatores foram significativos, assim como, o efeito de interação entre a temperatura e o tempo ($p < 0,05$).

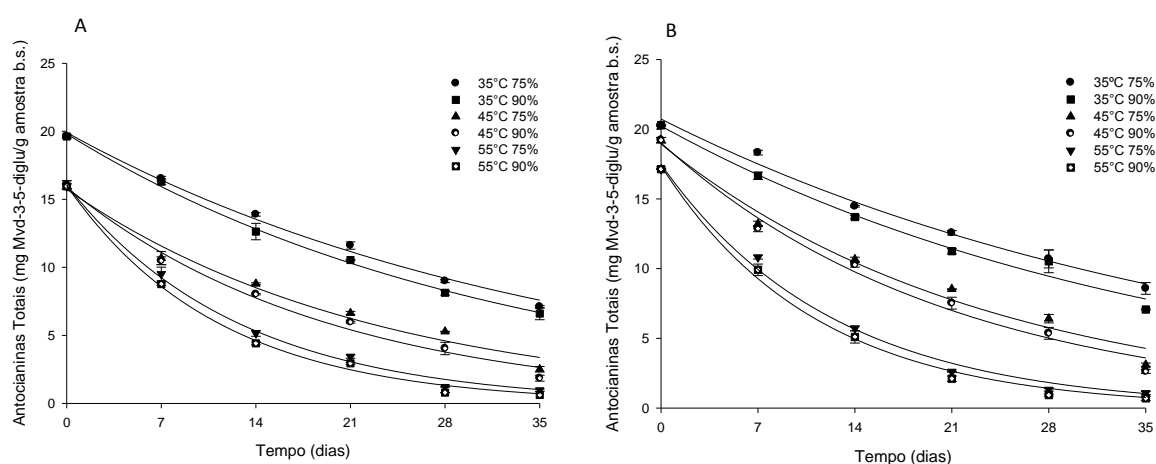


Fig. 3. Efeito da temperatura (35, 45 e 55 °C) e umidade relativa (75 e 90%) no conteúdo de antocianinas monoméricas totais (mg malvidina-2,5-diglicosídeo) das micropartículas de extrato fenólico de casca de uva Bordô elaboradas utilizando 5% de povidona e 5% de goma guar parcialmente hidrolisada por atomização (A) e liofilização (B).

As retenções das antocianinas monoméricas totais (Tabela 2) foram significativamente menores ($p < 0,05$) com o aumento da temperatura. Zhang, Zhou, Liu, Khan, Huang e Gu (2012) indicam que a degradação das antocianinas é causada principalmente pela clivagem de ligações covalentes e aumento das reações de oxidação com aumento da temperatura, formando compostos incolores. A estabilidade e a degradação das antocianinas podem variar entre os diferentes tipos de antocianinas existentes, sendo assim, de acordo com Piffaut, Kader, Girardin e Metche (1994) a degradação térmica e enzimática das malvidinas inicia-se pela hidrólise das ligações glicosídicas, que desestabilizam a molécula e leva à posterior ruptura do anel.

Além de degradação, as antocianinas podem sofrer polimerização durante o armazenamento prolongado (Ochoa, Kessler, Vulloud & Lozano, 1999). As reações responsáveis pelo escurecimento e polimerização dos pigmentos podem ser enzimáticas, pela atividade de enzimas endógenas que não foram totalmente inativadas, e não enzimáticas, como, por exemplo, condensação entre antocianinas e outros compostos fenólicos e reação de Maillard (Brownmiller, Howard & Prior, 2008; Wrolstad, Skrede, Lea & Enersen 1990). A presença de açúcares e proteínas no extrato pode resultar na reação de Maillard, que geralmente ocorre durante o processamento a altas temperaturas ou durante armazenamento prolongado, e que causa a condensação das antocianinas com hidroximetilfurfural, formando compostos de coloração castanha (Jiménez, Bohuon, Dornier, Bonazzi, Pérez & Vaillant, 2012; Tonon, Brabet & Hubinger, 2010). A análise de antocianinas monoméricas por pH diferencial, método utilizado neste estudo, não determina as antocianinas polimerizadas, ou seja, o método quantifica somente as antocianinas monoméricas, e sendo assim, não necessariamente toda a redução do conteúdo significa que houve degradação, sendo que parte das moléculas podem ter sofrido polimerização (Lee et al., 2005).

Quanto à umidade relativa, a redução de antocianinas monoméricas foi maior quando utilizada 90%. Em armazenamento a 35 °C, as micropartículas tiveram retenção significativamente menor ($p < 0,05$) em 90% de umidade relativa (34,9%) quando comparado a 75% de umidade relativa (42,3%). Tonon et al. (2010) também observaram maior redução do conteúdo de antocianinas de açaí em pó com o aumento da umidade relativa, devido à maior mobilidade das moléculas no interior dos alimentos, o que facilita as reações de degradação. O método de secagem influenciou a retenção das antocianinas monoméricas somente em armazenamento a 35 °C e 75% de umidade relativa, onde o pó liofilizado teve retenção significativamente maior que o pó atomizado ($p < 0,05$). Fang et al. (2011), observaram perdas de 9 a 94% das antocianinas monoméricas de suco de *bayberry* encapsulado e armazenado a 40 °C com diferentes atividades de água por 6 meses. Souza et al. (2014), encapsularam extrato de resíduo de uva bordô com maltodextrina, e armazenaram a 25 °C e 32,8% de umidade relativa, e tiveram perdas de 19 a 30% no conteúdo total de antocianinas em 120 dias. Entretanto, é importante observar que as temperaturas e umidades relativas utilizadas neste estudo foram superiores às usadas por Souza et al. (2014).

Quando os valores de conteúdos de antocianinas foram tratados dentro dos modelos cinéticos de estabilidade, observou-se que seguiu um comportamento cinético de primeira ordem. Este tipo de comportamento é característico das antocianinas, sendo encontrado em vários estudos de degradação cinética das mesmas (Cao et al., 2012; Flores et al., 2014b; Jiménez et al., 2012; Souza et al., 2014). Os resultados da análise de regressão demonstraram que os dados foram bem ajustados ao modelo cinético e termodinâmicos, pois em todos os casos os valores de coeficiente de determinação foram maiores que a 0,97. Os parâmetros cinéticos e termodinâmicos k , D , $t_{1/2}$, z , E_a , Q_{10} , ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger e ΔS^\ddagger podem ser vistos na Tabela 2.

A constante de velocidade (k) é um parâmetro que permite a previsão da degradação térmica das antocianinas, e quanto menor o valor maior a estabilidade (Loypimai, Moongngarm & Chottanom, 2016). Os valores de k obtidos aumentaram com o aumento da temperatura e da umidade relativa. De acordo com Al-Zubaidy e Khalil (2007) o aumento da taxa de degradação ocorre principalmente devido ao aumento no número de colisões entre as moléculas. Turturica et al. (2016) também observaram aumento das constantes de velocidade de degradação das antocianinas monoméricas de extrato de ameixa com a temperatura, e indicam que o aumento na degradação ocorre devido à oxidação e clivagem de ligações covalentes. Os valores de D variaram de 25,7 a 95,5 dias, e os valores do $t_{1/2}$ de 7,7 a 28,8 dias, e ambos diminuíram com o aumento da temperatura e da umidade relativa. O método de secagem influenciou muito pouco os valores de D e $t_{1/2}$, que foram muito próximos em todas as condições de armazenamento estudadas. Souza et al. (2014) encontraram $t_{1/2}$ de 233,5 a 461,2 dias para extrato de bagaço de uva bordô encapsulado com maltodextrina (10 a 30%) em armazenamento a 25 °C e umidade relativa de 38,2% por 120 dias.

O coeficiente de resistência térmica (z) descreve a influência da temperatura sobre os valores de D ao longo da variação de temperaturas utilizadas em medições experimentais (Heldman, 2011), e é usado para expressar a dependência à temperatura das reações de degradação que ocorrem nos alimentos durante o processamento a armazenamento. Os valores para os pós atomizados foram de 43,9 °C, superiores aos dos liofilizados que tiveram valores de z de aproximadamente 38 °C. Este resultado indica que o pó atomizado é mais estável às mudanças de temperatura do que o pó liofilizado.

Tabela 2. Dados cinéticos, termodinâmicos e retenção final das antocianinas monoméricas totais das micropartículas elaboradas a partir do extrato fenólico de casca de uva Bordô, utilizando 5% de polidextrose e 5% de goma guar parcialmente hidrolisada como material de parede, armazenado em condições aceleradas por 35 dias*.

	k (dias ⁻¹)	D (dias)	$t_{1/2}$ (dias)	z (°C)	E_a (KJ/mol)	Q_{10}	ΔG^\ddagger (kJ mol ⁻¹)	ΔH^\ddagger (kJ mol ⁻¹)	ΔS^\ddagger (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	Retenção 35 dias (%)
Atomizado	75% 35 °C	0,0276±0,0012	83,4±3,6	25,1±1,1	43,9±0,2	44,0±0,1	84,71±0,11	41,48±0,09	-132,04±0,08	36,2 ^b
	75% 45 °C	0,0440±0,0038	52,3±4,6	15,8±1,4		1,59±0,07	86,32±0,23	41,40±0,09	-132,94±0,45	15,6 ^{c,d}
	75% 55 °C	0,0789±0,0032	29,2±1,2	8,8±0,4		1,80±0,08	87,52±0,11	41,32±0,09	-132,55±0,07	6,1 ^e
	90% 35 °C	0,0311±0,0008	74,0±1,9	22,3±0,6	43,9±0,8	44,1±0,8	84,40±0,07	41,49±0,79	-131,02±2,78	33,6 ^b
	90% 45 °C	0,0513±0,0034	44,9±2,9	13,5±0,9		1,65±0,07	85,91±0,18	41,40±0,79	-131,64±3,04	11,5 ^d
	90% 55 °C	0,0889±0,0039	25,9±1,1	7,8±0,3		1,74±0,04	87,19±0,12	41,32±0,79	-131,54±2,77	3,9 ^e
Liofilizado	75% 35 °C	0,0241±0,0013	95,5±5,2	28,8±1,6	38,2±0,3	50,7±0,4	85,22±0,14	48,12±0,41	-112,12±1,79	42,3 ^a
	75% 45 °C	0,0425±0,0036	54,2±4,6	16,3±1,4		1,76±0,05	86,49±0,23	48,04±0,41	-112,59±2,00	16,1 ^c
	75% 55 °C	0,0807±0,0051	28,5±1,8	8,6±0,5		1,90±0,04	87,46±0,17	47,96±0,41	-112,11±1,78	6,3 ^e
	90% 35 °C	0,0272±0,0018	84,7±5,6	25,5±1,7	38,6±0,4	50,1±0,5	84,91±0,17	47,96±0,53	-113,09±1,16	34,9 ^b
	90% 45 °C	0,0476±0,0032	48,4±3,3	14,6±1,0		1,75±0,00	86,19±0,18	47,34±0,53	-113,55±1,10	13,7 ^{c,d}
	90% 55 °C	0,0897±0,0048	25,7±1,4	7,7±0,4		1,89±0,03	87,17±0,15	47,35±0,53	-113,08±1,17	4,1 ^e

*Amostras armazenadas em diferentes temperaturas (35, 45 e 55 °C) e umidades relativas (75 e 90%). Letras minúsculas iguais em uma mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Em relação à energia de ativação (E_a), os pós liofilizados tiveram maiores valores (aproximadamente 50 kJ/mol) que os atomizados (aproximadamente 44 kJ/mol). De acordo com Heldman (2011) as constantes de energia de ativação da degradação de antocianinas variam de 35 a 125 kJ/mol. Nas reações com altas energias de ativação, os substratos tendem a serem degradados mais rapidamente com menores mudanças de temperatura, quando empregadas temperaturas mais elevadas. Quando comparadas as energias de ativação dos pós, o liofilizado pode ser considerado menos estável que o atomizado quando armazenado em temperaturas mais altas. Os valores de Q_{10} , que indicam quão mais rápido uma reação ocorre quando a temperatura é aumentada 10 °C, foram um pouco superiores para os pós liofilizados. Valores relativamente baixos de Q_{10} sugerem a importância das associações moleculares que podem reduzir a taxa de degradação das antocianinas, o que pode ser confirmado pela determinação da energia de ativação e outras funções termodinâmicas (Al-Zubaidy et al., 2007). De acordo com Toledo (2007) o valor do Q_{10} para degradação de pigmentos naturais é, geralmente, em torno de 2.

Apesar de os valores de z e E_a indicarem que o pó liofilizado menos estável às mudanças de temperatura, quando utilizadas temperaturas mais elevadas, os valores de D e $t_{1/2}$ foram muito próximos entre os dois pós, o que indica pouca diferença de estabilidade entre eles nas temperaturas utilizadas neste estudo. Este resultado é corroborado pelas retenções finais, já mencionadas anteriormente, que foram significativamente maiores ($p < 0,05$) para o pó liofilizado em 35 °C, e não diferiram significativamente entre os pós nas duas outras temperaturas testadas.

Os valores da energia livre de Gibbs foram próximos para as micropartículas elaboradas por atomização e por liofilização em todas as condições de armazenamento, variando de 84,4 a 87,5 kJ mol⁻¹. Valores de energia de Gibbs próximos indicam que a taxa de degradação das antocianinas monoméricas é influenciada por fatores similares nos diferentes tratamentos (Al-Zubaidy et al., 2007). O sinal positivo dos valores de ΔG^\ddagger encontrados indica que a degradação das antocianinas monoméricas se deu por uma reação não espontânea (Lago & Noreña, 2014; Mercali, Gurak, Schmitz & Marczak, 2015). A energia livre de Gibbs está relacionada com o equilíbrio e a espontaneidade do processo, e revela o aumento da energia total do sistema (Georgieva, Zvezdova & Vlaev, 2012; Mercali et al., 2015). Os valores de ΔG^\ddagger aumentaram com o aumento da temperatura e da

degradação das antocianinas. Outros autores observaram comportamento semelhante da energia livre de Gibbs em reações degradativas de antocianinas, entretanto com valores maiores. Martynenko & Chen (2016) encontraram valores de ΔG^\ddagger de 102,17 a 106,0 kJ mol⁻¹ quando avaliada a degradação das antocianinas em tratamento hidrotermodinâmico (70 a 105 °C) de mirtilo. Mercali et al. (2015) tiveram valores de ΔG^\ddagger de 102,5 a 104,2 kJ mol⁻¹ quando observada a degradação das antocianinas durante aquecimento de suco de jabuticaba de 70 a 90 °C.

Os valores de ΔH^\ddagger variaram de 41,3 a 48,1 kJ mol⁻¹, sendo que as micropartículas elaboradas por liofilização tiveram valores maiores que as atomizadas em todas as condições de armazenamento. Maiores valores de ΔH^\ddagger indicam menor estabilidade dos compostos bioativos ao aumento da temperatura (Karaaslan, Yilmaz, Cesur, Vardin, İkinci & Dalgiç, 2014). Os valores positivos da entalpia indicam que a degradação das antocianinas é uma reação endotérmica (Al-Zubaidy et al., 2007). Outros autores também observaram valores de ΔH^\ddagger positivos para reações de degradação de antocianinas (Martynenko et al., 2016; Mercali et al., 2015).

Os valores de ΔS^\ddagger para as micropartículas liofilizadas variaram de -112,1 a -113,6 J mol⁻¹ K⁻¹, enquanto que para as atomizadas houve variação de -131,0 a -132,9 J mol⁻¹ K⁻¹. A entropia mede a variação da desordem das moléculas no sistema (Mercali et al., 2015) e indica o quão perto o sistema está de seu equilíbrio termodinâmico (Georgieva et al., 2012). Os valores de ΔS^\ddagger negativos indicam aumento da ordem, ou seja, o material passou por um rearranjo físico ou químico da estrutura inicial, ficando perto de seu equilíbrio termodinâmico (Al-Zubaidy et al., 2007; Georgieva et al., 2012). Tanto os valores de E_a , quanto os de ΔH^\ddagger e ΔS^\ddagger foram maiores para as micropartículas elaboradas por liofilização, o que significa, principalmente, que as constantes de velocidade de reação da degradação das antocianinas do pó liofilizado são mais sensíveis à temperatura do que as do pó atomizado (Karaaslan et al., 2014).

3.2.3. Efeito das condições armazenamento na atividade antioxidante das micropartículas

Na Figura 4 pode ser observado que houve uma grande redução na atividade antioxidante nos primeiros 7 dias de armazenamento, e após, houve estabilização ou lenta diminuição da atividade, comportamento similar ao dos fenóis totais.

Quando avaliado o efeito dos fatores temperatura, umidade relativa, tempo e suas interações, a ANOVA mostrou que a somente a temperatura e o tempo foram significativos ($p < 0,05$).

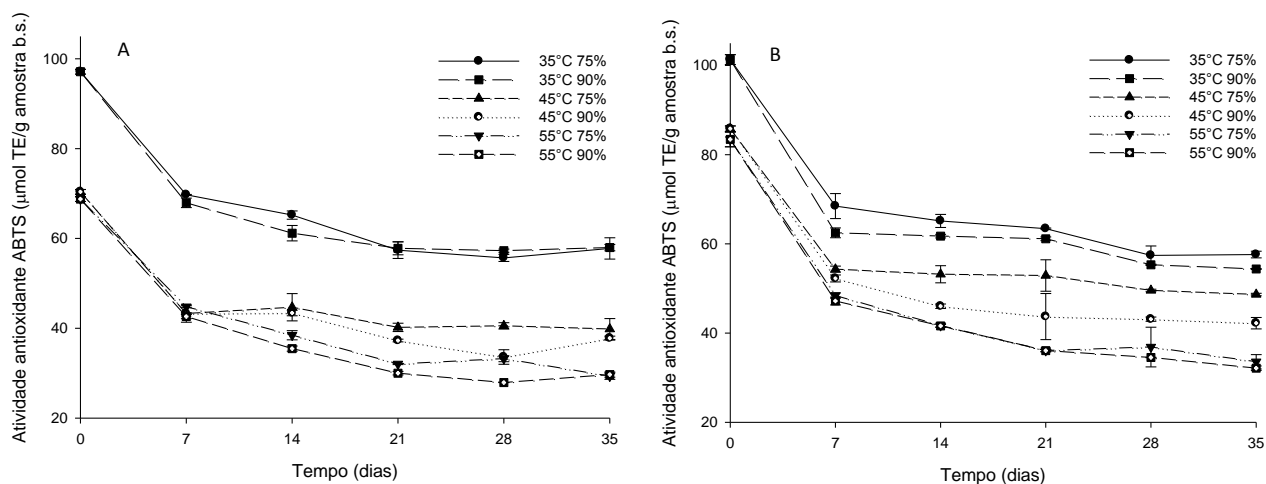


Fig. 4. Efeito da temperatura (35, 45 e 55 °C) e umidade relativa (75 e 90%) de armazenamento na atividade antioxidante (ABTS*, μmol de TE/g amostra em base seca) das micropartículas de extrato fenólico de casca de uva Bordô elaboradas utilizando 5% de povidona e 5% de goma guar parcialmente hidrolisada por atomização (A) e liofilização (B).

A retenção da atividade antioxidante variou de 38,5% a 59,5% (Tabela 4), e diminuíram significativamente ($p < 0,05$) com o aumento da temperatura. A umidade relativa influenciou somente o pó liofilizado armazenado a 45 °C, onde o armazenamento em 90% de umidade relativa diminuiu significativamente a retenção em relação ao armazenamento em 75% de umidade relativa. Quanto ao método de secagem utilizado, não houve influência nas retenções da atividade antioxidante, com exceção dos pós armazenados a 35 °C e 90% de umidade relativa, onde o pó atomizado teve retenção significativamente maior ($p < 0,05$) que o pó liofilizado.

A redução da atividade antioxidante durante o armazenamento está associada à diminuição nos conteúdos de fenóis e antocianinas monoméricas. A análise de correlação de Pearson indicou forte correlação da atividade antioxidante com os fenóis totais (0,89) e antocianinas monoméricas totais (0,92). Apesar da grande redução do conteúdo de antocianinas monoméricas a redução da atividade antioxidante não foi na mesma ordem de grandeza, assim como os compostos

fenólicos, que não sofreram grandes reduções nos conteúdos. Durante o aquecimento ou armazenamento prolongado, parte da degradação dos polifenóis, dentre eles as antocianinas, ocorre por hidrólise ou polimerização das moléculas, formando novos compostos que podem compensar totalmente ou parcialmente as perdas de atividade antioxidante decorrente, principalmente, da redução do conteúdo de antocianinas monoméricas (Cao et al., 2012; Chang et al., 2006; Flores et al., 2014b; Hager, Howard & Prior, 2008).

De acordo com Tsai e Huang (2004) a formação de antocianinas poliméricas em experimentos utilizando hibisco, não afetou significativamente a atividade antioxidante medida pelo radical ABTS[•]. Sadilova, Carle e Stintzing (2007) analisaram a degradação da fração antociânica purificada de *elderberry*, cenoura preta e morango após aquecimento, e observaram que a retenção da atividade antioxidante foi superior a retenção das antocianinas. Os autores indicam que isso ocorre devido à formação de produtos de degradação, e que estes produtos podem variar e ter diferentes atividades antioxidantes em diferentes alimentos. Entretanto, os autores ainda ressaltam que os produtos de degradação não compensaram totalmente a degradação das antocianinas, visto que houve redução significativa dos valores de atividade antioxidante após o fim do aquecimento.

Tabela 4. Atividade antioxidante* das micropartículas elaboradas a partir do extrato fenólico de casca de uva Bordô utilizando 5% de polidextrose e 5% de goma guar parcialmente hidrolisada como material de parede, armazenado em condições aceleradas por 35 dias.

		0	7	14	21	28	35	Retenção 35 dias (%)
Atomizado	75% 35 °C	97,13±0,53 ^A	69,71±0,09 ^B	65,20±0,92 ^B	57,40±1,85 ^B	55,65±0,79 ^B	57,77±2,38 ^B	59,5 ^{a,b}
	75% 45 °C	70,37±0,53 ^A	43,27±1,94 ^B	44,68±3,04 ^B	40,20±0,92 ^B	40,54±0,70 ^B	39,82±2,33 ^B	56,6 ^{a,b}
	75% 55 °C	68,76±0,53 ^A	44,80±0,22 ^B	38,45±1,01 ^C	32,05±0,13 ^D	33,23±0,66 ^D	29,34±0,70 ^E	42,7 ^d
	90% 35 °C	97,13±0,53 ^A	67,91±1,06 ^B	61,16±1,72 ^C	57,80±1,45 ^C	57,27±0,35 ^C	57,96±0,70 ^C	59,7 ^a
	90% 45 °C	70,37±0,53 ^A	43,27±0,18 ^B	43,39±0,62 ^B	37,27±0,31 ^C	33,60±1,63 ^D	37,80±0,44 ^C	53,7 ^{b,c}
	90% 55 °C	68,76±0,53 ^A	42,62±0,48 ^B	35,47±0,57 ^C	29,99±0,40 ^D	27,91±0,01 ^D	29,68±0,57 ^D	43,2 ^d
Liofilizado	75% 35 °C	101,32±1,10 ^A	68,48±2,80 ^B	65,13±1,47 ^B	63,41±0,14 ^{B,C}	57,41±2,11 ^C	57,61±0,73 ^C	56,9 ^{a,b}
	75% 45 °C	85,81±0,64 ^A	54,33±0,69 ^B	53,19±1,93 ^B	52,90±3,53 ^B	49,56±0,28 ^B	48,65±0,28 ^B	56,7 ^{a,b}
	75% 55 °C	83,42±1,66 ^A	48,42±0,60 ^B	41,71±0,37 ^{B,C}	36,09±0,23 ^C	36,87±4,45 ^C	33,56±1,61 ^C	40,2 ^d
	90% 35 °C	101,32±1,10 ^A	62,47±1,10 ^B	61,73±0,41 ^B	61,14±0,41 ^B	55,30±0,14 ^C	54,36±0,09 ^C	53,7 ^{b,c}
	90% 45 °C	85,81±0,65 ^A	52,25±0,78 ^B	46,02±0,50 ^{C,D}	43,70±5,17 ^C	43,12±0,48 ^{D,E}	42,22±1,28 ^E	49,2 ^c
	90% 55 °C	83,42±1,66 ^A	47,19±0,87 ^B	41,61±0,32 ^C	36,06±0,28 ^D	34,53±0,05 ^{D,E}	32,13±0,50 ^E	38,5 ^d

Atividade antioxidante medida pelo método ABTS e expressa em μmol de Trolox equivalente por g de amostra em base seca. Letras maiúsculas iguais em uma mesma linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

3.3. Simulação da digestão gastrointestinal

O efeito da simulação da digestão *in vitro* na liberação dos compostos fenólicos das micropartículas foi dividido em duas fases. A primeira é a do trato gastrointestinal superior ou fase gástrica (pH 1-3), que envolve as etapas da boca e estômago na primeira e segunda hora do experimento, e a segunda, trato gastrointestinal inferior ou fase intestinal (pH próximo da neutralidade), que abrange o intestino delgado e corresponde à terceira e quarta hora do experimento (Flores et al., 2014a). Em relação à biodisponibilidade dos fenóis, sabe-se que as agliconas podem ser absorvidas a partir do intestino delgado, entretanto, a maioria dos polifenóis presentes nos alimentos se encontram na forma de ésteres, glicosídeos ou polímeros, que devem ser previamente hidrolisadas por enzimas intestinais ou pela microflora do cólon para então poderem ser absorvidos no intestino (Manach, Scalbert, Morand, Rémésy & Jiménez, 2004). Os fenóis totais, antocianinas monoméricas totais e a atividade antioxidante variaram pouco entre os dois métodos utilizados na secagem (liofilização e atomização), e variaram de forma mais expressiva em relação ao tempo de digestão (Fig. 5). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as micropartículas atomizadas e liofilizadas no percentual de liberação de fenóis, antocianinas monoméricas e na atividade antioxidante em um mesmo tempo de digestão.

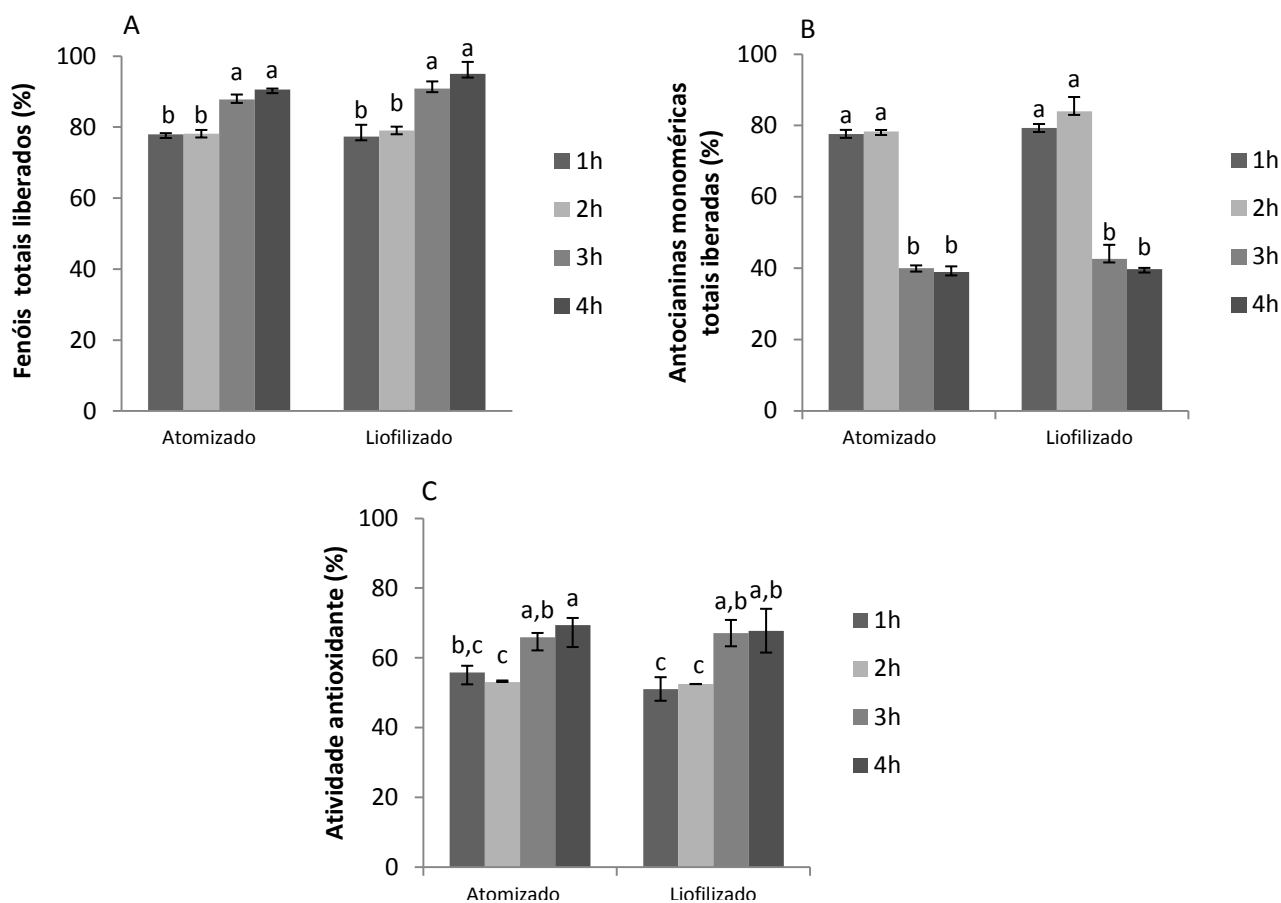


Fig.5. Percentual de liberação de fenóis totais (A), antocianinas monoméricas totais (B) e atividade antioxidante (C) durante o processo de simulação da digestão gastrointestinal, onde a primeira e segunda hora correspondem a fase gástrica (boca e estômago) e a terceira e quarta hora correspondem a fase intestinal (intestino delgado).

Os fenóis totais tiveram alta liberação durante a fase gástrica (primeira e segunda hora), onde houve a liberação máxima (aproximadamente 80%), com um aumento significativo ($p < 0,05$) durante a fase intestinal. As micropartículas atomizadas tiveram 90,6% dos polifenóis liberados, enquanto que as liofilizadas tiveram 94,9% de liberação. Comportamento semelhante foi encontrado em outros trabalhos avaliando a estabilidade dos polifenóis frente às condições de digestão gastrointestinal (Bouayed, Hoffmann & Bohn, 2011; Saikia, Mahnot & Mahanta, 2015), e pode estar relacionado com o material de parede utilizado na encapsulação (Saikia, Mahnot & Mahanta, 2015), principalmente com o tamanho da sua cadeia e a sua solubilidade no pH do meio. A povidona e a goma guar parcialmente

hidrolisada são polímeros altamente solúveis em água, entretanto possuem baixíssima digestibilidade no intestino delgado, devido a sua resistência à hidrólise pelas enzimas presentes no organismo, chegando praticamente intactas ao cólon, onde são parcialmente ou totalmente fermentadas pela microbiota presente (Flood, Auerbach & Craig, 2004; Mudgil & Barak, 2013; Yoon, Chu & Juneja, 2008). Dessa forma, acredita-se que a liberação dos compostos fenólicos se deu através da solubilização das micropartículas, visto que não ocorre hidrólise dos polímeros até a fase estudada.

Os polifenóis são sensíveis ao pH mais próximo da neutralidade encontrado no intestino delgado, e durante a digestão, uma proporção destes pode se transformar em outros compostos com formas estruturais e propriedades químicas diferentes (Bermúdez-Soto et al., 2007; Pinacho, Caverro, Astiasarán, Ansorena & Calvo, 2015). A hidrólise e polimerização de alguns compostos fenólicos para a formação de outros pode estar relacionado com o aumento do conteúdo observado na terceira e quarta hora do experimento. Os produtos da degradação das antocianinas são alguns dos compostos que podem contribuir com o este aumento durante a etapa intestinal (McDougall, Dobson, Smith, Blake & Stewart, 2005).

Ao contrário do teor de fenóis totais, as antocianinas apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) do conteúdo total na fase intestinal da digestão (terceira e quarta hora), comportamento semelhante ao observado por Flores, Singh, Kerr, Phillips & Kong (2015) para extrato de mirtilo encapsulado com proteína de soro isolada. As antocianinas são altamente sensíveis a pHs neutros ou alcalinos, o que já foi observado por diversos autores que avaliaram a estabilidade das antocianinas no processo digestivo (Bouayed et al., 2011; Liang et al., 2002; McDougall et al., 2005; Pérez-Vicente, Gil-Izquierdo & García-Viguera, 2002). Sabe-se que existem em equilíbrio quatro espécies moleculares de antocianinas (o cátion flavílio e três estruturas secundárias: base quinoidal, carbinol pseudobase e chalcona pseudobase), e um dos motivos para a baixa recuperação de antocianinas pode ser a transformação do cátion flavílio (colorido) à pseudobase chalcona (incolor) em pH intestinal, com subsequente cisão do anel e formação de chalconas ionizadas (Liang et al., 2002; McDougall et al., 2005; Pérez-Vicente et al., 2002). Não é possível afirmar qual é a causa da redução do conteúdo de antocianinas monoméricas totais durante a fase intestinal da digestão. Uma possibilidade é que, devido ao pH elevado encontrado nesta fase do experimento, pode haver

metabolização de antocianinas a formas não coloridas, que não são quantificadas pelo método espectrofotométrico utilizado, e podem ser posteriormente degradadas, formando outros compostos, como por exemplo, compostos fenólicos de menor tamanho molecular (Liang et al., 2002; Pérez-Vicente et al., 2002).

O trato gastrointestinal está constantemente exposto a espécies reativas de oxigênio, cloro e nitrogênio, que são ingeridos na dieta ou produzidos no próprio organismo (Halliwell, Rafter & Jenner, 2005), e os antioxidantes podem desempenhar um papel importante na manutenção do equilíbrio redox, prevenindo doenças do trato gastrointestinal ligadas a geração de radicais durante o processo digestivo (Bouayed et al., 2011). A atividade antioxidante apresentou comportamento semelhante aos fenóis totais, com um aumento significativo ($p < 0,05$) na fase intestinal (terceira e quarta hora), onde as micropartículas elaboradas por atomização tiveram 69,4% da atividade antioxidante e as liofilizadas 67,8%. A atividade antioxidante dos polifenóis está relacionada com o pH e com a estrutura química dos compostos fenólicos presentes na etapa da digestão (Kamiloglu, Pasli, Ozcelik, Camp & Capanoglu, 2015). De acordo com Tagliazucchi et al., (2010) a atividade antioxidante dos fenóis é pH-dependente, e poderia ter um maior efeito protetor contra o estresse oxidativo nas células intestinais do que nas células do estômago, visto que os polifenóis apresentam maior capacidade sequestrante no pH encontrado no intestino. Este aumento da atividade antioxidante na fase intestinal ocorre provavelmente pela desprotonação dos grupamentos hidroxila presentes no anel aromático na transição do meio ácido para o alcalino (Bouayed et al., 2011).

Apesar da grande redução do conteúdo de antocianinas monoméricas totais na fase intestinal, o percentual de retenção da atividade antioxidante foi próximo a 70%. Este comportamento foi semelhante ao observado na avaliação da estabilidade das micropartículas ao armazenamento, e ocorre devido à formação de novos compostos provenientes da hidrólise e polimerização dos compostos originais.

4. Conclusões

A avaliação da estabilidade das micropartículas indicou que, para os polifenóis totais nas provas aceleradas de estabilidade houve uma significativa redução do conteúdo nos primeiros sete dias de armazenamento, porém após 35 dias as retenções foram de 82,5 a 93,5%, sendo significativo o efeito da temperatura. A simulação da digestão gastrointestinal apontou que a maior parte dos

compostos fenólicos foram liberados na fase gástrica. Para as antocianinas monoméricas totais, as provas de estabilidade indicaram que a temperatura, a umidade relativa e o tempo afetaram o conteúdo de antocianinas, sendo que as retenções após 35 dias variaram de 3,9 a 42,3%, e a perda de conteúdo com o tempo exibiu cinética de primeira ordem. As provas de simulação de digestão indicaram que as antocianinas monoméricas tiveram uma redução do seu conteúdo na fase intestinal, devido ao pH alcalino do meio. A atividade antioxidante teve comportamento semelhante ao dos fenóis totais, entretanto, suas retenções finais variaram de 38,5 a 59,5%. Na simulação gastrointestinal, os valores da atividade antioxidante foram próximos a 70% na fase intestinal. Apesar da redução nos conteúdos de compostos bioativos, as retenções obtidas para atividade antioxidante foram promissoras, e mais estudos deverão ser feitos a fim de avaliar a estabilidade destes produtos em matrizes alimentícias.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer à FAPERGS, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro e à R&S Blumos pela doação da goma guar parcialmente hidrolisada.

Referências

Aguilera, J. M., & Stanley, D. W. (1999). *Microstructural principles of food processing and engineering*. (2nd ed.). USA: Aspen (Chapter 2, 9).

Al-Zubaidy, M.M.I., & Khalil, R.A. (2007). Kinetic and prediction studies of ascorbic acid degradation in normal and concentrate local lemon juice during storage. *Food Chemistry*, 101, 254-259.

Barbané, D., Venturini Filho, W.G., & Bolini, H.M. (2007). Análise Descritiva Quantitativa de Vinhos Produzidos com Uvas Niágara Rosada e Bordô. *Brazilian Journal of Food Technology*, 10 (2), 122-129.

Bermúdez-Soto, M.-J., Tomás-Barberán, F.-A., & García-Conesa, M.-T. (2007). Stability of polyphenol in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, 102, 865-874.

Bouayed, J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128, 14-21.

Breda, C.A., Sanjinez-Argandoña, E.J., & Correia, C. de A.C. (2010). Shelf life of powdered *Campomanesia adamantium* pulp in controlled environments. *Food Chemistry*, 135, 2960-2964.

Brownmiller, C., Howard, L.R., & Prior, R.L. (2008). Processing and Storage Effects on Monomeric Anthocyanins, Percent Polymeric Color, and Antioxidant Capacity of Processed Blueberry Products. *Journal of Food Science*, 73(5), H73-H79.

Cao, X., Bi, X., Huang, W., Wu, J., & Liao, X. (2012). Changes of quality of high hydrostatic pressure processed cloudy and clear strawberry juices during storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 181-190.

Chang, Q., Zuo, Z., Chow, M.S.S., & Ho, W.K.K. (2006). Effect of storage temperature on phenolics stability in hawthorn (*Crataegus pinnatifida* var. *major*) fruits and a hawthorn drink. *Food Chemistry*, 98, 426-430.

Danisman, G., Arslan, E., & Toklucu, A.K. (2015). Kinetic Analysis of Anthocyanin Degradation and Polymeric Colour Formation in Grape Juice during Heating. *Czech Journal of Food Sciences*, 33(2), 103-108.

Fang, Z., & Bhandari, B. (2011). Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*, 129, 1139-1147.

Ferrari, C. C., Germer, S. P. M., Alvim, I. D., Vissotto, F. Z., & Aguirre, J. M. (2012). Influence of carrier agents on the physicochemical properties of blackberry powder produced by spray drying. *International Journal of Food Science & Technology*, 47, 1237-1245.

Flores, F.P., Singh, R.K., Kerr, W.L., Pegg, R.B., & Kong, F. (2014a). Total phenolics content and antioxidant capacities of microencapsulated blueberry anthocyanins during *in vitro* digestion. *Food Chemistry*, 153, 272-278.

Flores, F.P., Singh, R.K., & Kong, F. (2014b). Physical and storage properties of spray-dried blueberry pomace extract with whey protein isolate as wall material. *Journal of Food Engineering*, 137, 1-6.

Flood, M.T., Auerbach, M.H., & Craig, S.A.S. (2004). A review of the clinical toleration studies of polydextrose in food. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 1531-1542.

Georgieva, V., Zvezdova, D., & Vlaev, L. (2012). Non-isothermal kinetics of thermal degradation of chitosan. *Chemistry Central Journal*, 6, 81-91.

Hager, T.J., Howard, L.R., & Prior, R.L. (2008). Processing and Storage Effects on Monomeric Anthocyanins, Percent Polymeric Color, and Antioxidant Capacity of Processed Blueberry Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 689-695.

Halliwell, B., Rafter, J., & Jenner, A. (2005). Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(suppl), 268S-276S.

Hamama, A. A., & Nawar, W. W. (1991). Thermal decomposition of some phenolic antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1063-1069.

Heldman, D. R. (2011). *Food preservation process design*. San Diego: Academic Press, (Chapter 2, 4).

Henríquez, C., Córdova, A., Almonacid, S., & Saavedra, J. (2014). Kinetic modeling of phenolic compound degradation during drum-drying of apple peel by-products. *Journal of Food Engineering*, 143, 146-153.

Hou, Z., Qin, P., Zhang, Y., Cui, S., & Ren, G. (2013). Identification of anthocyanins isolated from black rice (*Oryza sativa* L.) and their degradation kinetics. *Food Research International*, 50, 691-697.

Jiménez, N., Bohuon, P., Dornier, M., Bonazzi, C., Pérez, A.M., & Vaillant, F. (2012). Effect of water activity on anthocyanin degradation and browning kinetics at high temperatures (100-140 °C). *Food Research International*, 47, 106-115.

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*, 24, 889-894.

Kamiloglu, S., Pasli, A.A., Ozcelik, B., Camp, J.V., & Capanoglu, E. (2015). Influence of different processing and storage conditions on *in vitro* bioaccessibility of polyphenols in black carrots jams and marmalades. *Food Chemistry*, 186, 74-82.

Kandansamy, K., Somasundaram, P.D. (2012). Microencapsulation of Colors by Spray Drying – A Review. *International Journal of Food Engineering*, 8(2), Article 1.

Kara, S., & Erçelebi, E.A. (2013). Thermal degradation kinetics of anthocyanins and visual colour of Urmu mulberry (*Morus nigra* L.). *Journal of Food Engineering*, 116, 541-547.

Karaaslan, M., Yilmaz, F.M., Cesur, O., Vardin, H., İkinci, A., & Dalgiç, A.C. (2014). Drying kinetics and thermal degradation of phenolic compounds and anthocyanins in pomegranate arils dried under vacuum conditions. *International Journal of Food Science & Technology*, 49, 595-605.

Khazaei, K. M., Jafari, S. M., Ghorbani, M., & Kakhki, A. H. (2014). Application of maltodextrin and gum Arabic in microencapsulation of saffron petal's anthocyanins and evaluating their storage stability and color. *Carbohydrate Polymers*, 105, 57-62.

Kuck, L.S, & Noreña, C.P.Z. (2016). Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. *Food Chemistry*, 194, 569-576.

Lago, C.C., & Noreña, C.P.Z. (2014). Kinetic and Thermodynamic of Thermal Inactivation of the Peroxidase, Polyphenoloxidase and Inulinase Activities during Blanching of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) Juice. *Food Bioprocess Technology*, 7, 3560-3568.

Lago-Vanzela, E.S., Da-Silva, R., Gomes, E., García-Romero, E., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2011). Phenolic Composition of the Edible Parts (Flesh and Skin) of Bordô Grape (*Vitis labrusca*) Using HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 13136-13146.

Larrauri, J. A., Rupérez, P., & Saura-Calixto, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1390-1393.

Lee, J., Durst, R.W., & Wrolstad, R.E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269-1278.

Liang, L., Wu, X., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., Zou, Y., Mao, G., & Yang, L. (2012). *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropupurea* Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Research International*, 46, 76-82.

Loypimai, P., Moongngarm, A., & Chottanon, P. (2016). Thermal and pH degradation kinetics of anthocyanins in natural food colorant prepared from black rice bran. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 461-470.

Man, Y. B. C., Irwandi, J., & Abdullah, W. J. W. (1999). Effect of different types of maltodextrin and drying methods on physico-chemical and sensory properties of encapsulated durian flavor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1075-1080.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.

Martynenko, A., & Chen, Y. (2016). Degradation kinetics of total anthocyanins and formation of polymeric color in blueberry hydrothermodynamic (HTD) processing. *Journal of Food Engineering*, 171, 44-51.

Mathiowitz, E., Kreitz, M. R., & Brannon-Peppas, L. (1999). Microencapsulation. In Mathiowitz, E. (Ed.), *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery* (pp. 493-553). New York: John Wiley and Sons.

McDougall, G.J., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., & Stewart, D. (2005). Assessing Potential Bioavailability of Raspberry Anthocyanins Using an in Vitro Digestion System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5896-5904.

Mercali, G.D., Gurak, P.D., Schmitz, F., & Marczak, L.D.F. (2015). Evaluation of non-thermal effects of electricity on anthocyanin degradation ohmic heating of jaboricaba (*Myrciaria cauliflora*) juice. *Food Chemistry*, 171, 200-205.

Moraga, G., Igual, M., García-Martínez, E., Mosquera, L.H., & Martínez-Navarrete, N. (2012). Effect of relative humidity and storage time on the bioactive compounds and functional properties of grapefruit powder. *Journal of Food Engineering*, 112, 191-199.

Mrkic, V., Cocci, E., Dalla Rosa, M., & Sacchetti, G. (2006). Effect of drying conditions on bioactive compounds and antioxidant activity of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1559-1566.

Mudgil, D., & Barak, S. (2013). Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 1-6.

Ochoa, M.R., Kessler, A.G., Vullioud, M.B., & Lozano, J.E. (1999). Physical and Chemical Characteristics of Raspberry Pulp: Storage Effect on Composition and Color. *LWT- Food Science and Technology*, 32, 149-153.

Pérez-Vicente, A., Gil-Izquierdo, A., & García-Viguera, C. (2002). In Vitro Gastrointestinal Digestion Study of Pomegranate Juice Phenolic Compounds,

Anthocyanins, and Vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2308-2312.

Pinacho, R., Cavero, R.Y., Astiasarán, I., Ansorena, D., & Calvo, M.I. (2015). Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of *in vitro* digestion on their antioxidant capacity. *Journal of Functional Foods*, 19, 49-62.

Pitalua, E., Jimenez, M., Vernon-Carter, E.J., & Beristain, C.I. (2010). Antioxidative activity of microcapsules with beetroot juice using gum Arabic as wall material. *Food and Bioproducts Processing*, 88, 253-258.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152-159.

Richards, M., De Kock, H.L., & Buys, E.M. (2010). Multivariate accelerated shelf-life test of low fat UHT milk. *International Dairy Journal*, 36, 38-45.

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

Rodrigo, R., Miranda, A., & Vergara, L. (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*, 412, 410-424.

Rosenberg, M., Kopelman, I. J., & Talmon, Y. (1985). A scanning electron microscopy study of microencapsulation. *Journal of Food Science*, 50, 139-144.

Sadilova, E., Carle, R., & Stintzing, F.C. (2007). Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and *in vitro* antioxidant capacity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 1461-1471.

Saikia, S., Mahnot, N.K., & Mahanta, C.L. (2015). Optimisation of phenolic extraction from *Averrhoa carambola* pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. *Food Chemistry*, 171, 144-152.

Silva, P. I., Stringheta, P. C., Teófilo, R. F., & 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, 538-544.

Singleton, V.L., & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.

Souza, V.B., Fujita, A., Thomazini, M., Silva, E.R., Lucon Jr, J.F., Genovese, M.I., & Favaro-Trindade, C.S. (2014). Functional properties and stability of spray-dried pigments from Bordo grape (*Vitis labrusca*) winemaking pomace. *Food Chemistry*, 164, 380-386.

Stamp, J.A., Labuza, T.P. (1983). Kinetics of the Maillard reaction between aspartame and glucose in solution at high temperatures. *Journal of Food Science*, 48, 543-544.

Sun-Waterhouse, D., & Waterhouse, G.I.N (2015). Spray-Drying of Green or Gold Kiwifruit Juice-Milk Mixtures; Novel Formulations and Processes to Retain Natural Fruit Colour and Antioxidants. *Food Bioprocess Technology*, 8, 191-207.

Toaldo, I. M., Fogolari, O., Pimentel, G. C., Gois, J. S., Borges, D. L. G., Caliari, V., & Bordignon-Luiz, M. (2013). Effect of grape seeds on the polyphenol bioactive content and elemental composition by ICP-MS of grape juices from *Vitis labrusca* L. *LWT – Food Science and Technology*, 53, 1-8.

Toledo, R.T. (2007). *Fundamentals of Food Process Engineering*. (3rd ed.). New York: Springer, (Chapter 8).

Tonon, R.V., Brabet, C., & Hubinger, M.D. (2010). Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*, 43, 907-914.

Tsai, P-J., & Huang, H-P. (2004). Effect of polymerization on the antioxidant capacity of anthocyanins in Roselle. *Food Research International*, 37, 313-318.

Turturica, M., Stanciuc, N., Bahrim, G., & Rapeanu, G. (2016). Effect of thermal treatment on phenolic compounds from plum (*prunus domestica*) extracts – A kinetic study. *Journal of Food Engineering*, 171, 200-207.

Wrolstad, R.E., Skrede, G., Lea, P., & Enersen, G. (1990). Influence of Sugar on Anthocyanin Pigment Stability in Frozen Strawberries. *Journal of Food Science*, 55(4), 1064-1072.

Yoon, S.-J., Chu, D.-C., & Juneja, L.R. (2008). Chemical and Physical Properties, Safety and Application of Partially Hydrolyzed Guar Gum as Dietary Fiber. *Journal of Clinical Biochemistry Nutrition*, 42, 1-7.

Zhang, L., Zhou, J., Liu, H., Khan, M.A., Huang, K., & Gu, Z. (2012). Compositions of anthocyanins in blackberry juice and their thermal degradation in relation to antioxidant activity. *European Food Research Technology*, 253, 637-645.

CAPÍTULO 5

Efeito do tratamento com irradiação UV-C e banho ultrassônico na pós-colheita de uvas (*Vitis labrusca* L.) Bordô

Luiza Siede Kuck^{a,*}, Caciano Pelayo Zapata Noreña^a

^aLaboratório de Engenharia de Processos em Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43.212, Campus do Vale, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43.212, Campus do Vale, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil Tel.: +55 051 3308 7791; fax: +55 051 3308 7048.

E-mail address: luizakuck@yahoo.com.br (L. S. Kuck).

Artigo a ser formatado e submetido para publicação na revista *Postharvest Biology and Technology*.

Resumo

Com o objetivo de verificar o aumento do teor de compostos fenólicos, uvas Bordô de diferentes safras foram submetidas à irradiação UV-C (120 W). Na primeira safra as uvas foram submetidas a 0, 0,5, 1, 4, 10 e 30 minutos de irradiação, armazenadas a 22 °C, enquanto que na segunda safra as uvas foram submetidas a irradiações com UV-C por 0, 0,5 e 4 minutos, combinada com ultrassom (40 kHz) por 5 minutos e armazenadas a 22 °C. Na primeira safra, as uvas não apresentaram aumento dos compostos bioativos e da atividade antioxidante. Na segunda safra, houve aumento significativo dos compostos bioativos para as uvas irradiadas por 0,5 minutos com UV-C e para as irradiadas com UV-C por 4 minutos e tratadas com ultrassom por 5 minutos, com aumentos de 1,2 a 2,0 vezes no conteúdo de fenóis totais, antocianinas monoméricas totais e na atividade antioxidante, não havendo mudanças significativas na cor das uvas irradiadas.

Palavras-chave: fenóis totais, antocianinas monoméricas totais, atividade antioxidante, cor.

1 Introdução

A uva (*Vitis* sp.) é uma das frutas mais cultivadas e consumidas no mundo (Xu, Zhang, Cao & Lu, 2010), tanto *in natura* quanto processada. No Brasil, as variedades americanas de uva (*Vitis labrusca* L.) são amplamente cultivadas, e representam mais de 80% da uva utilizada para a produção de sucos, vinhos de mesa e outros produtos, sendo as variedades mais cultivadas a Bordô, Concord e Isabel (Burin, Ferreira-Lima, Panceri & Bordignon-Luiz, 2014; Lago-Vanzela, Da-Silva, Gomes, García-Romero & Hermosín-Gutiérrez, 2011).

As plantas possuem compostos que são denominados metabólitos secundários, que compreendem três grandes grupos: terpenoides, alcaloides e compostos fenólicos. As uvas são ricas em compostos fenólicos, e, dentre as uvas de variedades americanas, a uva Bordô é uma das cultivares mais ricas em polifenóis (Burin, Ferreira-Lima, Panceri & Bordignon-Luiz, 2014; Toaldo et al., 2013). Os polifenóis que podem ser encontrados na casca da uva são em grande parte flavonoides, como antocianinas, flavonols e flavanols, e os não-flavonoides, representados principalmente pelos ácidos fenólicos e estilbenos como o resveratrol (Garrido & Borges, 2011; Pinelo, Arnous & Meyer, 2006). Estes compostos possuem

atividade antioxidante, pois através do seu potencial redox, agem como doadores de hidrogênio ou elétrons e como agentes quelantes de íons metálicos, prevenindo a formação de radicais (Rice-Evans, Miller & Paganga, 1997; Salah et al., 1995), o que pode estar relacionado à efeitos benéficos à saúde, como a redução da incidência de doenças degenerativas.

A biossíntese dos flavonoides, estilbenos, hidroxicinamatos e ácidos fenólicos envolvem diversas rotas metabólicas, baseadas principalmente nas vias do ácido chiquímico ou chiquimato, fenilpropanoide e flavonoide (Crozier, Clifford e Ashihara, 2006). A via fenilpropanoide é uma importante via do metabolismo secundário, onde a fenilalanina é convertida em diversos metabólitos secundários da classe dos fenóis, como ácidos fenólicos, flavonoides, ligninas e estilbenos. As principais enzimas envolvidas são a fenilalanina amônia liase (PAL), a cinamato-4-hidroxilase (C4H) e a 4-coumarato: coenzima A ligase (4CL) (Chen, Wen, Kong, Pan, Wan & Huang, 2006). A maior parte dos polifenóis que são encontrados em plantas são resultantes da desaminação da L-fenilalanina pela PAL, formando ácido cinâmico, que por sua vez é hidroxilado e, frequentemente, metilado, para gerar ácido cumárico, e posteriormente caféico e ferúlico (Boudet, 2007; Hopkins & Hüner, 2008; Petersen, Hans & Matern, 2010). Os ácidos fenólicos simples formados nestas reações não se acumulam nas plantas em grandes quantidades, e tem como principal função serem utilizados como precursores de derivados mais complexos (Hopkins & Hüner, 2008; Petersen, Hans & Matern, 2010).

As plantas podem sofrer estresses bióticos, devido à presença de insetos, fungos, bactérias, etc, ou abióticos, tais como o estresse físico (luz e temperaturas) e químico, relacionados ao meio em que a planta está (Hopkins & Huner, 2008). Quando submetida a algum desses estresses, normalmente ocorre aumento na produção de metabólitos secundários, dentre eles, os polifenóis. Isto ocorre porque uma série de eventos metabólicos é desencadeada, envolvendo com uma ampla variedade de compostos relacionados com a qualidade dos frutos. Acredita-se que ocorra modificação da transcrição de genes fundamentais na ativação ou repressão da transcrição de outros genes, como os relacionados com a qualidade dos frutos (Vom Endt, Kijne & Memelink, 2002). Um dos resultados é a maior atividade de síntese de compostos fenólicos, resultante, sobretudo, do aumento da atividade das enzimas envolvidas no processo, principalmente a PAL (Fritzemeier & Kindl, 1981; Pombo, Rosli, Martínez & Civello, 2011).

Diversos estudos mostram que a irradiação com UV-C aumenta o teor de polifenóis, principalmente do resveratrol, em uvas da variedade Napoleon (Cantos, García-Viguera, Pascual-Teresa & Tomás-Barberán, 2000), Tempranillo, Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah, Monastrell, Garnacha, Cariñena (Cantos, Tomás-Barberán, Martínez & Espín, 2003), Red Globe (Crupi, Pichierri, Basile & Antonacci, 2013), Orion, Regent, Graciano, Palomino, Tintilla de Rota (Guerrero, Puertas, Fernández, Palma & Cantos-Villar, 2010), Beta, Jingxu (Liu, Liu, Yang, Wang & Li, 2010), dentre outras. Entretanto, dados sobre o comportamento da variedade Bordô submetida à irradiação UV-C são escassos.

A utilização de ultrassom é outra técnica que pode ser empregada a fim de produzir uma condição de estresse e aumentar a produção de metabólitos secundários. Hasan & Baek (2013) estudaram o efeito da utilização de ultrassom em cascas de uva (*Vitis labrusca* x *Vitis vinifera*) e observaram que houve aumento da síntese de resveratrol através do aumento da expressão da enzima resveratrol sintase. Tiwari, Patras, Brunton, Cullen & O'Donnell (2010) avaliaram o efeito do ultrassom em suco de uva e observaram redução no conteúdo de algumas antocianinas. Assim, acredita-se que a utilização de ultrassom pode ter alguns efeitos positivos e negativos no tratamento pós-colheita da uva. Entretanto, ainda não há relatos de estudos avaliando as consequências da utilização de ultrassom na pós-colheita de uva Bordô. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento pós-colheita de uvas Bordô com UV-C e ultrassom nos teores de polifenóis e antocianinas totais, na atividade antioxidante e na cor.

2 Material e Métodos

2.1 Material

As uvas (*Vitis labrusca* L.) Bordô foram obtidas diretamente com o produtor na cidade de Cotiporã, Rio Grande do Sul, Brasil, as quais foram colhidas e conduzidas ao laboratório. DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico), e ácido gálico foram obtidos da Sigma (Sigma-Aldrich). Os demais reagentes utilizados foram reagentes de grau analítico.

2.2 Metodologia experimental

Os experimentos foram divididos em duas etapas (1 e 2), os quais foram feitos com uvas de duas safras diferentes. A partir do primeiro experimento,

utilizando os melhores resultados, foi planejado o segundo experimento, onde além dos tratamentos foram modificados os tempos de armazenamento e método de extração dos compostos bioativos.

2.2.1 Experimento 1

As uvas (safra 2013/2014) foram recebidas, selecionadas e lavadas com água destilada. A seguir, seis cachos de uvas foram distribuídos em uma câmara, totalmente revestida internamente em papel alumínio, constituída de 4 lâmpadas UV-C de 30 W (potência de 120 W), distantes 40 cm das amostras. As uvas foram irradiadas de acordo com o recomendado por Gonzáles-Barrio, Salmenkallio-Marttila, Tomás-Barberán, Cantos & Espín (2005), que consiste em irradiar ambos os lados dos cachos de forma homogênea. Os tempos de irradiação utilizados foram 0,5, 1, 4, 10 e 30 minutos. A seguir, os cachos foram armazenados dentro de bandejas em câmara incubadora (411/FDP, Ethik Technology) a 22 °C, em ausência de luz. Alguns cachos não irradiados foram mantidos na incubadora como controle. Cerca de 24 bagas (aproximadamente 4 bagas de cada cacho, retiradas de diferentes lados dos cachos, para cada tempo de amostragem) de cada tratamento foram retiradas para análises logo após os tratamentos (tempo 0) e após 24 e 48 horas de armazenamento, e foram congeladas a -18 °C até o momento das análises.

A extração dos componentes bioativos para realização das análises foi feita de acordo com Cantos, Espin, Francisco & Tomás-Barberán (2002), onde 1 g de casca triturada foi misturado a 4 mL de metanol:ácido fórmico (97:3 v/v), permanecendo em repouso por 60 minutos em ausência de luz. Posteriormente as amostras foram centrifugadas (Thermo, 16R, Thermo Scientific) a 5000xg por 5 minutos sob refrigeração (4 °C) e filtradas utilizando papel filtro Whatman nº01. A extração foi efetuada em triplicata.

2.2.2 Experimento 2

As uvas (safra 2014/2015) foram recebidas, selecionadas e lavadas com água destilada, e submetidas a quatro diferentes tratamentos, utilizando irradiação por UV-C e ultrassom, os quais podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1. Tratamentos aplicados às uvas var. Bordô.

Tratamento	UV-C	Ultrassom
T0	-	-
T1	0,5 minutos	-
T2	0,5 minutos	5 minutos
T3	4 minutos	-
T4	4 minutos	5 minutos

A irradiação com UV-C foi conduzida de forma igual ao primeiro experimento. Para aplicação do ultrassom, logo após a irradiação, os cachos (6 cachos para cada tratamento) foram colocados em banho ultrassônico (40 kHz, Unique USC 700) com água destilada por 5 minutos, conforme sugerido por Hasan et al. (2013). A seguir, os cachos foram retirados da água, secos com papel toalha, acondicionados em bandejas e colocados em incubadora a 22 °C, em ausência de luz, juntamente com os cachos irradiados. Cachos não tratados foram mantidos na incubadora como controle. Foram retiradas bagas de todos os cachos tratados (aproximadamente 4 de cada cacho, retiradas de diferentes lados dos cachos, para cada tempo de amostragem) logo após os tratamentos (tempo 0) e nos tempos 6, 24 e 48 horas de armazenamento. As cascas foram retiradas manualmente das bagas e congeladas a -60 °C por 24 horas e depois liofilizadas por 30 horas.

A extração dos compostos foi feita de forma exaustiva com base nas metodologias de Lago-Vanzela et al. (2003) e Rodrigues, Mariutti & Mercadante (2013). Para a extração 0,2 g de amostra foram misturadas a 10 mL de solvente metanol:água (8:2 v/v) e misturadas em agitador do tipo *vórtex* por 4 minutos, centrifugadas a 3700xg por 10 minutos a 4 °C, e filtradas utilizando papel filtro Whatman n°01. A operação foi repetida 4 vezes, e os extratos foram misturados em um balão de 50 mL, onde o volume faltante foi preenchido com solvente. A extração foi efetuada em triplicata.

2.2.3 Análises químicas

As análises de fenóis totais, antocianinas totais e atividade antioxidante foram feitas utilizando espectrofotômetro (Genesys S10, Thermo Scientific), a partir dos extratos obtidos em cada experimento.

Os fenóis totais foram determinados utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). As leituras foram realizadas a 765 nm e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico (GAE) por g de amostra em base seca.

As antocianinas monoméricas totais foram determinadas conforme metodologia de Lee, Durst & Wrolstad (2005). As leituras das absorvâncias foram feitas em espectrofotômetro a 520 e 700 nm. Os resultados foram expressos em mg de malvidina-3,5-diglicosídeo (mvd-3,5-dg) (absortividade molar 37000 L/cm/mol e massa molar 724,5 g/mol) por g de amostra em base seca.

A atividade antioxidante das amostras foi determinada pelo método de sequestro de radical DPPH (Brand-Williams, Cuvelier & Berset, 1995). A absorvância das amostras foi determinada em espectrofotômetro, a 515 nm, após 3 horas, que é o tempo que a reação leva para atingir o seu platô, determinado previamente. Uma curva padrão de Trolox foi construída, e os resultados foram expressos em μmol de Trolox equivalente (TE) por g de amostra em base seca.

2.2.4 Determinação de cor

A cor das uvas foi medida utilizando um colorímetro (CR400/410, Minolta), de acordo com o sistema CIEL a^*b^* , onde L^* indica a luminosidade (0 = preto e 100 = branco), e a^* e b^* , as coordenadas de cromaticidade indicam tonalidade da coloração para verde ($-a^*$)/vermelho($+a^*$) e azul ($-b^*$)/amarelo($+b^*$) (Bakker, Bridle & Timberlake, 1986). O instrumento foi calibrado utilizando placa de cerâmica branca. A partir de a^* e b^* , foram calculados os valores do ângulo *Hue* ($H^* = \tan^{-1} b^*/a^*$), que indica a cor da amostra (0° ou 360° = vermelho, 90° = amarelo, 180° = verde e 270° = azul) e do *Croma* ($C^* = [a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$), que indica pureza ou saturação da amostra (valores altos significam coloração mais vívida ou pura) (Bakker et al., 1986; Hernández-Herrero & Frutos, 2014). Os parâmetros de cor foram determinados em no mínimo 10 bagas, retiradas de diferentes cachos, para cada tratamento.

2.2.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos às análises estatísticas de ANOVA e os tratamentos às provas de comparações múltiplas de médias de Tukey, utilizando o software SAS 9.3.

3 Resultados e discussão

3.1 Experimento 1

Os conteúdos de fenóis totais, antocianinas monoméricas totais e atividade antioxidante das amostras controle e para os diversos tempos de irradiação são mostrados na Figura 1. Observa-se que após irradiação houve diminuição significativa no conteúdo de fenóis após 24 horas de armazenamento, porém os mesmos aumentaram com o tempo de armazenamento, sendo que para os tempos de 0,5 e 4 minutos os teores não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$) que do controle após 48 horas de armazenamento (Figura 1A). Nos demais casos houve diminuição do conteúdo de fenóis na faixa de 13 a 26% em relação ao controle em um mesmo tempo de armazenamento. Diversos estudos tem comprovado o aumento do teor de polifenóis e de resveratrol, especificamente, quando diferentes cultivares de uvas foram irradiados com UV-C. Estudos da irradiação de uvas cv. Napoleon a 90 W por 30 min (Cantos et al., 2000), uvas Tempranillo, Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah, Monastrell, Garnacha e Carriñena a 510 W por 30 segundos (Cantos et al., 2003) e uvas Orion, Regent, Merlot, Syrah, Graciano, Tempranillo, Palomino, Tintilla de Rota a 510 W por 60 segundos (Guerrero, Puertas, Fernández, Palma & Cantos-Villar, 2010), resultaram em incrementos de 2 a 10 vezes nos teores de fenóis, ou de resveratrol. Guerrero, Puertas, Fernández, Piñeiro & Cantos-Villar (2010) também encontraram maior conteúdo de polifenóis totais em vinho elaborado com uvas irradiadas do que em vinho elaborado com uvas não irradiadas. Entretanto, Pala & Toklucu (2013) não encontraram diferença significativa no teor de fenóis totais e na atividade antioxidante de sucos produzidos com uvas brancas e vermelhas com e sem irradiação e, Henrique (2015), também não observou o aumento do conteúdo de fenóis totais na produção de suco de uva Bordô tratada com UV-C.

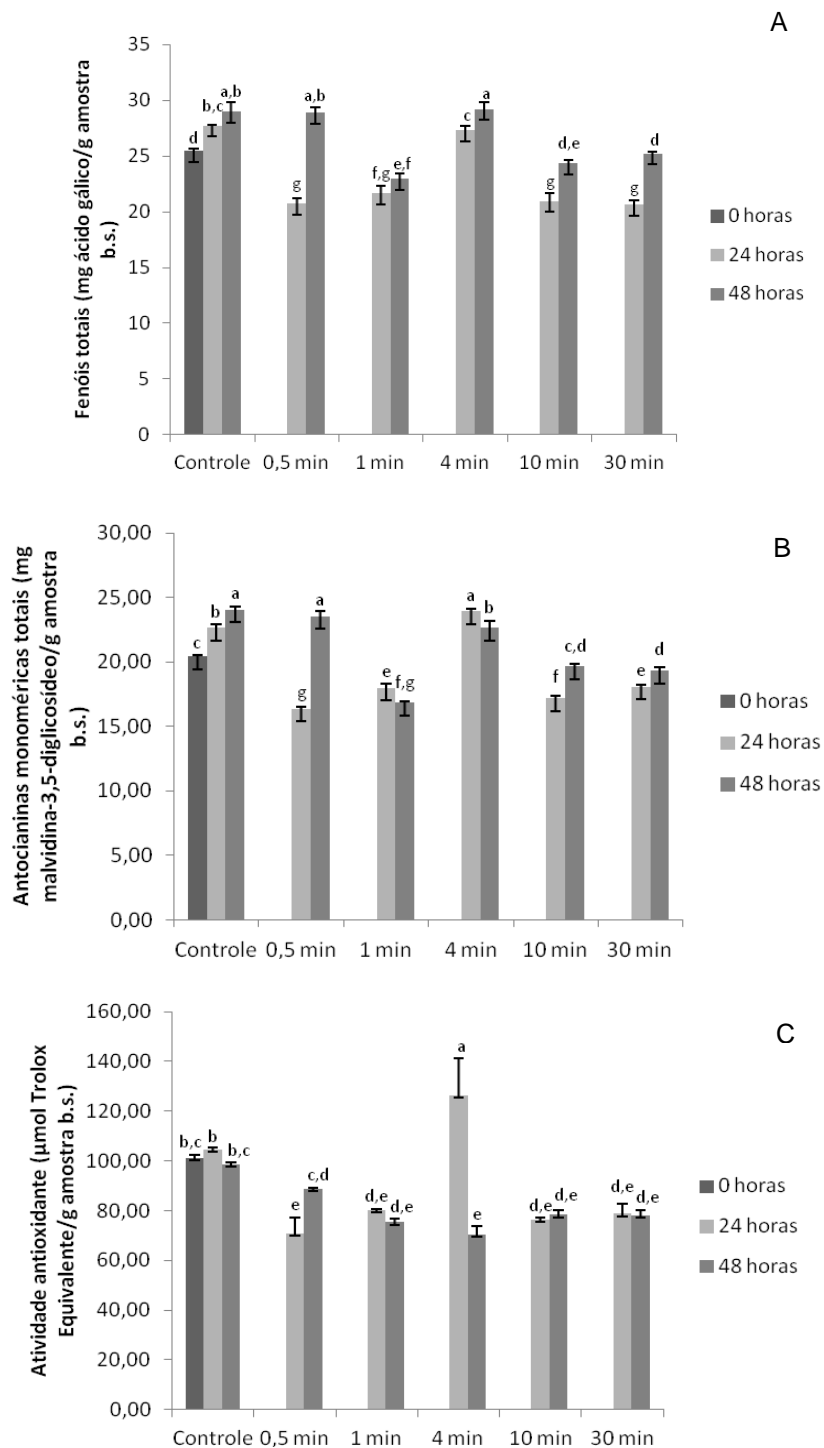


Figura 1. Teor de fenóis totais (A), antocianinas monoméricas totais (B) e atividade antioxidante (C) da casca de uva Bordô irradiados com UV-C por 0,5, 1, 4, 10 e 30 minutos, e do controle, e posterior armazenamento a 22 °C nos tempos 0, 24 e 48 horas. Diferentes letras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Existem diversos fatores que podem ser responsáveis pela diferença de comportamento da uva Bordô. Nem todos os tipos de polifenóis são induzidos à síntese por radiação UV, sendo que a principal classe induzida são os estilbenos (Crupi et al., 2013; Gonzáles-Barrio et al., 2009). De acordo com Liu et al. (2010), a capacidade de síntese de estilbenos pode ser ativada por fatores exógenos de estresse, entretanto, depende do genótipo da planta. Cantos et al. (2002) também observou que o conteúdo máximo de indução de resveratrol depende da variedade da uva. De acordo com Siemann & Creasy (1992), a origem geográfica, que inclui fatores como o solo e o clima, está ligada à síntese de resveratrol. Além disso, os autores ressaltam que diferenças na indução de síntese de estilbenos podem estar ligadas a fatores agronômicos, assim como ao grau de maturação. Este último pode ser um dos principais fatores associados ao comportamento observado neste estudo. A síntese de resveratrol é catalisada, dentre outras enzimas, pela estilbeno sintase (STS), que utiliza *p*-coumaril-CoA e malonil-CoA como substratos, e, por outro lado, a enzima chalcona sintase (CHS) utiliza os mesmos substratos para produção de chalcona, que é o precursor dos flavonoides (Chong, Poutaraud & Hugueney, 2009; Fritzeimer & Kindl, 1981). Com o aumento do grau de maturação, ocorre uma competição entre a estilbeno sintase e chalcona sintase, o que pode reduzir os teores de alguns compostos específicos nas uvas, como o resveratrol, e aumentar o acúmulo de outros, como alguns tipos de antocianinas (Jeandet, Sbaghi, Bessis & Meunier, 1995).

Por outro lado, as bagas de uva perdem gradualmente seu potencial de síntese de estilbenos (Keller, Steel & Creasy, 2000) à medida que se aproxima da maturidade. A expressão dos genes da via dos flavonoides também é dependente da fase de maturação da uva (Boss, Davies & Robinson, 1996). Sendo assim, um estágio muito avançado de maturação e uma possível redução no conteúdo da enzima PAL, pode ter evitado o aumento da atividade enzimática dos frutos, e consequentemente da competição entre a produção de estilbenos e antocianinas.

Outro possível fator de influência é a cor da uva, que de acordo com Cantos et al. (2002) a síntese de resveratrol não está ligada com a cor da uva, entretanto, Guerrero-Beltrán, Welti-Chanes & Barbósa-Cánovas (2009) sugerem que a forte cor violeta da uva pode bloquear ou diminuir a penetração da luz UV em suco de uva. A uva Bordô é conhecida por possuir coloração muito intensa. Os valores de L^*

determinados na análise colorimétrica ficaram abaixo de 32, valor que indica a tendência ao preto.

Quanto ao teor de antocianinas (Figura 1B), também não foi observado o efeito de irradiação no aumento de antocianinas, sendo que nas amostras irradiadas por 0,5 e 4 minutos (em 48 horas de estocagem), os conteúdos não foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) do controle e, nos outros casos verificou-se a perda de conteúdo de antocianinas entre 6 e 30% em relação ao controle para o mesmo tempo de armazenamento. Bakowska, Kucharska & Oszmianski (2003) observaram que a luz UV causa forte degradação de antocianinas que não estão copigmentadas, e que a copigmentação é uma alternativa para evitar a degradação das mesmas. Entretanto, Cantos et al. (2000) observou que não foi significativa a redução no teor de antocianinas em uvas Napoleon irradiadas (90 W por 30 minutos) em relação ao controle.

Quanto à atividade antioxidante por DPPH (Figura 1C), somente foi significativamente maior ($p < 0,05$) que o controle a amostra irradiada por 4 minutos, porém somente nas primeiras 24 horas de armazenamento, pois após 48 horas a atividade antioxidante diminuiu drasticamente em 44,2%. De acordo com Allothman, Bhat e Karim (2009), que avaliaram o efeito da irradiação UV-C em banana, abacaxi e goiaba, a redução da atividade antioxidante pode ser atribuída à oxidação de alguns grupos antioxidantes que contribuem significativamente para a atividade antioxidante durante a aplicação de UV-C.

Altas doses de raios UV-C ou UV-B podem levar à superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ao desenvolvimento de estresse oxidativo (Katerova, Todorova, Tasheva & Sergiev, 2012), o que pode causar a redução da atividade antioxidante, decorrente da diminuição dos compostos fenólicos, que imediatamente vão atuar estabilizando os radicais formados. Nesse caso, se o grau de maturação do fruto for muito avançado, a irradiação não desencadeará a intensificação da atividade das enzimas que sintetizam os polifenóis, não havendo aumento do conteúdo dos mesmos. Diversos autores têm testado a influência da radiação UV-C sobre soluções de padrões de polifenóis e em extratos vegetais, observando degradações de 15 a 85% (Volf, Ignat, Neamtu & Popa, 2014). Murugesan, Orsat & Lefsrud (2012) observaram o aumento e diminuição no teor de compostos fenólicos de *elderberry* tratado com UV-C, dependendo do tempo de aplicação. Em geral, o comportamento da atividade antioxidante das uvas irradiadas

foi similar ao dos fenóis e antocianinas, pois são estes compostos os que conferem a atividade antioxidante nas uvas.

Os parâmetros de cor avaliados (L^* , a^* , b^* , *Hue* e *Croma*) para os diversos tratamentos podem ser observados na Tabela 2. Quanto ao parâmetro L^* , os valores foram próximos a 30, indicando amostras com tendência ao preto, e não foram observadas diferenças significativas das amostras irradiadas com o controle no tempo 0 horas. Os parâmetros a^* e b^* foram negativos para todos os tratamentos, o que indica a presença de pigmentos verdes e azuis, e os valores de *Hue* ficaram entre 243 e 257°, próximos a 270° que é o ângulo que representa a cor azul. A cor azul é proporcionada pela presença de alguns tipos de antocianinas, sendo que a mais importante é a malvidina-3-glicosídeo (Schwartz, Von Elbee & Giusti, 2010), que é a antocianina monomérica presente em maior quantidade em uvas (Amico et al., 2004; Mazza, 1995). Os valores do *Croma* foram próximos de 0, o que indica uma baixa saturação de cor, pois o *Croma* indica a transição do cinza (valores baixos) para cores puras (valores altos) (Mazur, Nes, Wold, Remberg & Aaby, 2014). Os dados da tabela também demonstram que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras para os parâmetros b^* , *Hue* e *Croma*. Diversos autores têm relatado pouca ou nenhuma mudança na coloração de uvas irradiadas com UV-C ou dos sucos produzidos a partir destas, em relação aos seus respectivos controles (Cantos et al., 2000; Cantos, Espín & Tomás-Barberán, 2001; Guerrero-Beltrán et al., 2009).

Tabela 2. Parâmetros de cor das uvas Bordô irradiadas por UV-C em diferentes tempos e do controle após 24 e 48 horas de armazenamento a 22 °C.

	<i>L*</i>	<i>a*</i>	<i>b*</i>	<i>Hue</i>	<i>Croma</i>
0 horas	29,41±1,77 ^{a,b}	-0,21±0,11 ^{a,b}	-1,13±0,49 ^a	250,03±3,02 ^a	1,15±0,50 ^a
24 Horas					
Controle	31,38±0,68 ^a	-0,45±0,11 ^b	-1,71±0,47 ^a	244,97±4,62 ^a	1,77±0,46 ^a
0,5 min	28,76±0,56 ^{a,b}	-0,05±0,05 ^a	-1,44±0,85 ^a	257,50±2,18 ^a	1,44±0,85 ^a
1 min	28,90±1,24 ^{a,b}	-0,20±0,09 ^{a,b}	-1,77±0,63 ^a	252,82±4,69 ^a	1,78±0,62 ^a
4 min	29,17±1,09 ^{a,b}	-0,22±0,12 ^{a,b}	-1,42±0,36 ^a	251,39±3,24 ^a	1,43±0,37 ^a
10 min	28,04±0,91 ^b	-0,20±0,13 ^{a,b}	-1,06±0,35 ^a	248,70±6,72 ^a	1,08±0,35 ^a
30 min	28,96±1,03 ^{a,b}	-0,16±0,07 ^a	-0,98±0,29 ^a	250,45±2,30 ^a	1,08±0,35 ^a
48 Horas					
Controle	28,13±1,52 ^b	-0,30±0,08 ^{a,b}	-1,31±0,31 ^a	246,54±5,37 ^a	1,34±0,30 ^a
0,5 min	27,63±0,78 ^b	-0,21±0,15 ^{a,b}	-1,08±0,55 ^a	243,05±20,63 ^a	1,13±0,49 ^a
1 min	28,86±0,83 ^{a,b}	-0,17±0,11 ^a	-1,77±0,63 ^a	253,89±4,53 ^a	1,78±0,63 ^a
4 min	28,62±0,67 ^b	-0,21±0,05 ^{a,b}	-1,41±0,31 ^a	251,55±1,92 ^a	1,43±0,31 ^a
10 min	27,77±1,39 ^b	-0,22±0,15 ^{a,b}	-1,53±0,58 ^a	252,50±2,61 ^a	1,54±0,60 ^a
30 min	28,71±0,70 ^b	-0,14±0,12 ^a	-1,57±0,62 ^a	254,71±3,43 ^a	1,58±0,63 ^a

Diferentes letras em uma mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Com base nestes resultados, os tempos de irradiação de 0,5 e 4 minutos foram repetidos nas uvas Bordô da safra 2014/2015, assim como utilizados no tratamento assistido por ultrassonicamento (Tabela 1).

3.2 Experimento 2

Os teores de fenóis totais, antocianinas monoméricas totais e atividade antioxidante das uvas para os tratamentos (Tabela 1) e do controle durante o período de armazenamento são mostrados na Figura 2.

No conteúdo de fenóis totais (Figura 2A), o tratamento T1 (irradiado por 0,5 minutos) e T4 (irradiado por 4 minutos e ultrassonicado por 5 minutos) foram os que tiveram significativamente os maiores conteúdos de fenóis totais ($p < 0,05$), e mantiveram-se estáveis durante as 48 horas. O aumento no teor de polifenóis totais nas uvas tratadas com irradiação pode ocorrer devido ao fato de que em condições de estresse, uma série de eventos metabólicos é desencadeada, dentre os quais está o aumento da atividade das enzimas envolvidas no processo de síntese destes compostos, principalmente a PAL (Fritzemeier et al., 1981; Pombo et al., 2011). Ao contrário do primeiro experimento, os resultados obtidos no experimento 2 indicam um possível estresse dos frutos. Isto pode ter ocorrido por diferenças fisiológicas dos frutos nas duas safras, como, por exemplo, o grau de maturação. Além do aumento da atividade da enzima PAL, o aumento do conteúdo de compostos fenólicos de uvas irradiadas em relação aos seus controles não irradiados também tem sido atribuído à despolimerização e dissolução de polissacarídeos da parede celular, o que acaba facilitando a extração dos mesmos (Bhat, Sridhar & Tomita-Yokotani, 2007; Siddhuraju, Osoniyi, Makkar & Becker, 2002).

Com respeito ao tratamento T4, nosso estudo indicou que a utilização de ultrassom aumentou o teor de fenóis totais quando combinado com 4 minutos de irradiação, em relação ao mesmo tratamento sem utilização de ultrassom. Hasan, Yun, Kwak & Baek (2014) observaram no suco de uva Campbell Early, previamente tratada em banho ultrassônico, que apesar da redução do teor de fenóis totais, houve aumento do conteúdo de resveratrol, o qual pode estar ligado, dentre outros fatores, ao aumento da atividade da enzima PAL (Hasan et al., 2014). Quando comparados os tratamentos T1 e T4, que tiveram os melhores resultados, o tratamento T1 se torna bastante interessante, pois a amostra foi irradiada somente por 30 segundos, com baixo custo energético, além de que longos tempos de imersão em água podem trazer como consequência a lixiviação de compostos fenólicos por eles serem muito solúveis.

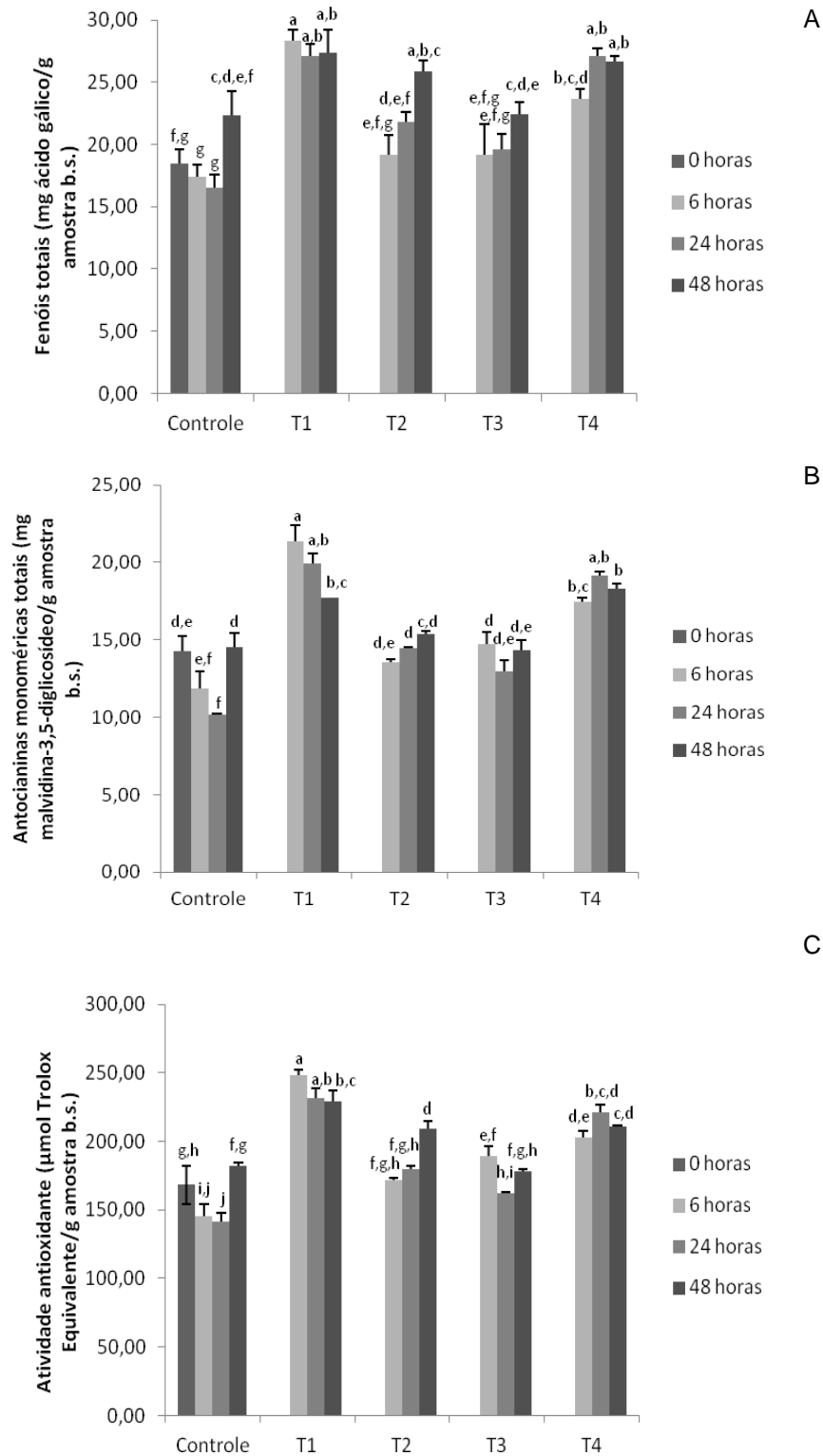


Figura 2. Teor de fenóis totais (A), antocianinas monoméricas totais (B) e atividade antioxidante (C) da casca de uva Bordô submetida à irradiação e ultrassonicamento, e seu controle (T0) após 6, 24 e 48 horas de armazenamento a 22 °C. T1 e T3: UV-C por 0,5 e 4 minutos; T2 e T4: UV-C por 0,5 e 4 minutos e ultrassom por 5 minutos. Diferentes letras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

De maneira geral, o aumento do conteúdo de polifenóis decorrente da irradiação pode variar entre diferentes variedades de uvas, tendo sido obtido, neste estudo, um aumento de até 1,6 vezes no conteúdo fenólico em relação ao controle em igual tempo de armazenamento. Guerrero et al. (2010) observaram um aumento de aproximadamente 2,5 vezes no conteúdo de polifenóis totais em vinho (*Vitis vinifera*, Palomino Fino) elaborado com uvas irradiadas (potência de irradiação 510 W) do que em vinho elaborado com uvas não irradiadas. A influência da irradiação UV-C depende da dose utilizada, da sensibilidade da espécie estudada e sua habilidade de atenuar os efeitos da irradiação (Lavola, Aphalo, Lahti, & Julkunen-Tiitto, 2003; Liu et al., 2010).

As antocianinas seguiram comportamento similar aos fenóis totais, com aumentos significativos ($p < 0,05$) nos conteúdos dos tratamentos T1 e T4, que variaram de 1,2 a 2,0 vezes em relação ao controle em um mesmo tempo de armazenamento. Sobre o comportamento no conteúdo de antocianinas monoméricas totais frente à irradiação UV-C, Cantos et al. (2001) não observaram diferença significativa no conteúdo de antocianinas de uvas cv. Napoleon irradiadas (potência de irradiação de 30 a 510 W) e não irradiadas. Crupi et al. (2013) encontraram diferentes comportamentos dos teores de antocianinas para uvas cv. Red Globe, dependendo da dose de irradiação utilizada e da temperatura de armazenamento. Zhang, Li, Chu, Zhang, Wen & Duan (2012) após aplicação de radiações UV-A, UV-B e UV-C em doses iguais em uvas cv. Cabernet Sauvignon observaram que tanto a irradiação UV-B quanto a UV-C resultaram no aumento do teor de antocianinas nas cascas das uvas. Os autores ainda sugerem que as radiações UV-B e UV-C podem induzir a uma maior formação de fotoassimilados em bagas de uvas maduras, que podem ser encaminhados para a via do ácido chiquímico, eventualmente apoiando a síntese de flavonoides. Henrique (2015) estudou a produção de sucos de uva Bordô tratada com UV-C e observou aumento do teor de antocianinas totais de aproximadamente 1,2 vezes, entretanto, não houve aumento do conteúdo de fenóis totais e da atividade antioxidante.

Os resultados da atividade antioxidante (Figura 2C) demonstram que seu comportamento foi similar aos dos conteúdos de fenóis e antocianinas monoméricas totais, com os maiores valores de atividade antioxidante obtidos nos tratamentos T1 e T4, sendo o maior conteúdo atingido de 248,44 μmol de Trolox equivalente por g de amostra, um aumento de 1,7 vezes em relação ao controle no mesmo tempo.

Os parâmetros de cor avaliados (L^* , a^* , b^* , *Hue* e *Croma*) para os diversos tratamentos podem ser observados na Tabela 3. Quanto ao parâmetro L^* , os valores variaram de 27,27 a 31,69, o que aponta a tendência das amostras para a cor preta. Nenhum tratamento diferiu significativamente ($p > 0,05$) do controle no tempo 0 horas, o que indica que tanto o tratamento com UV-C, quanto o tratamento com ultrassom, não influenciaram na luminosidade das uvas. Quanto ao parâmetro a^* , nenhum dos tratamentos diferiu significativamente ($p > 0,05$) do controle em 0 horas. Por outro lado, para os valores de b^* , todos os tratamentos diferiram significativamente ($p < 0,05$) do controle em 0 horas, com exceção do controle em 6 horas de armazenamento. Os parâmetros a^* e b^* tiveram valores próximos a 0, sendo os valores de a^* positivos e os de b^* negativos, o que indica a presença de uma mistura de pigmentos verdes e azuis conferindo cor à casca. A cor da uva, conferida pelos pigmentos, depende do estágio de maturação e da cultivar, sendo que os principais pigmentos são as antocianinas, que são responsáveis por cores que variam de rosa a vermelho e de violeta a azul escuro (Corrales, García, Butz & Tauscher, 2009; Falguera, Garza, Pagán, Garvín & Ibarz, 2013). As coordenadas de cromaticidade a^* e b^* apresentaram bastante variação durante as medições, devido à cor relativamente irregular das cascas, o que é corroborado pelos altos desvios padrões encontrados.

Os valores de *Hue* variaram de 278° a 344°, o que indica que a cor variou entre os ângulos 270° e 360°, que são os ângulos que representam as cores azul e vermelha, respectivamente. Os valores de *Croma* variaram de 0,18 a 1,93, que indicam que há uma baixa saturação ou intensidade da cor na casca das uvas, que ocorre devido à mistura de componentes, principalmente pigmentos.

Tabela 3. Parâmetros de cor das uvas Bordô tratadas com irradiação e banho ultrassônico e do controle após 24 e 48 horas de armazenamento a 22 °C.

	<i>L*</i>	<i>a*</i>	<i>b*</i>	<i>Hue</i>	<i>Croma</i>
0 horas	29,71±0,84 ^{A,B}	0,34±0,04 ^{A,B,C,D}	-1,90±0,71 ^E	281,11±4,23 ^E	1,93±0,70 ^A
6 Horas					
Controle	29,38±0,93 ^{A,B}	0,43±0,14 ^{A,B,C,D}	-1,40±0,16 ^{D,E}	287,34±7,24 ^E	1,47±0,11 ^{A,B}
T1	28,38±2,07 ^{A,B}	0,18±0,05 ^{C,D}	-0,32±0,08 ^{A,B}	300,22±4,89 ^{D,E}	0,37±0,08 ^{D,E}
T2	31,69±1,58 ^A	0,16±0,07 ^D	-0,91±0,13 ^{B,C,D}	279,87±3,04 ^E	0,93±0,14 ^{B,C,D}
T3	28,28±1,59 ^{A,B}	0,57±0,19 ^{A,B}	-0,53±0,12 ^{A,B,C}	316,23±5,28 ^{B,C,D}	0,78±0,21 ^{C,D,E}
T4	28,33±0,72 ^{A,B}	0,14±0,03 ^D	-1,00±0,21 ^{C,D}	277,97±2,14 ^E	1,01±0,21 ^{B,C,D}
24 Horas					
Controle	29,31±0,14 ^{A,B}	0,51±0,23 ^{A,B,C}	-0,45±0,15 ^{A,B,C}	317,14±11,85 ^{B,C,D}	0,68±0,24 ^{C,D,E}
T1	29,03±0,93 ^{A,B}	0,17±0,06 ^D	-0,58±0,10 ^{A,B,C}	286,53±6,71 ^E	0,60±0,09 ^{C,D,E}
T2	28,47±0,80 ^{A,B}	0,36±0,13 ^{A,B,C,D}	-0,09±0,02 ^A	343,80±8,99 ^A	0,37±0,12 ^{D,E}
T3	27,27±0,71 ^B	0,20±0,13 ^{C,D}	-0,29±0,06 ^{A,B}	302,74±11,48 ^{C,D,E}	0,36±0,12 ^{D,E}
T4	27,81±0,50 ^B	0,23±0,13 ^{C,D}	-1,02±0,18 ^{C,D}	281,88±5,42 ^E	1,04±0,20 ^{B,C}
48 Horas					
Controle	28,12±1,84 ^B	0,32±0,07 ^{A,B,C,D}	-0,20±0,05 ^A	327,53±6,56 ^{A,B,C}	0,38±0,07 ^{C,D,E}
T1	28,64±0,24 ^{A,B}	0,38±0,06 ^{A,B,C,D}	-0,27±0,08 ^{A,B}	325,28±5,98 ^{A,B,C}	0,47±0,09 ^{C,D,E}
T2	28,26±1,51 ^{A,B}	0,26±0,04 ^{B,C,D}	-0,26±0,12 ^A	316,23±17,63 ^{B,C,D}	0,38±0,05 ^{C,D,E}
T3	28,78±1,17 ^{A,B}	0,60±0,11 ^A	-0,48±0,09 ^{A,B,C}	321,06±4,79 ^{A,B,C,D}	0,77±0,12 ^{C,D,E}
T4	28,97±0,28 ^{A,B}	0,15±0,03 ^D	-0,07±0,03 ^A	334,17±10,56 ^{A,B}	0,17±0,04 ^E

T1: irradiada por 0,5 minutos; T2: irradiada por 0,5 minutos e ultrassonicada por 5 minutos; T3: irradiada por 4 minutos; e T4: irradiada por 4 minutos e ultrassonicada por 5 minutos.

Diferentes letras em uma mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

4 Conclusões

Os resultados obtidos na primeira safra indicaram que o uso de irradiação UV-C não resultou no aumento do conteúdo de compostos bioativos da uva Bordô, no entanto, na segunda safra, as uvas irradiadas por 0,5 minutos e as irradiadas por 4 minutos combinado com ultrassom por 5 minutos, tiveram aumento significativo do conteúdo de fenóis totais, antocianinas monoméricas totais e atividade antioxidante de 1,2 a 2,0 vezes em relação ao controle nos diferentes tempos de armazenamento. Não houve influência expressiva dos tratamentos pós-colheita na cor das uvas. Estudos futuros deverão ser realizados para observar se o grau de maturação e a potência da irradiação estão relacionados com a biossíntese de compostos fenólicos, além de verificar se ocorrem alterações na atividade da enzima PAL e no perfil fenólicos dos frutos após aplicação dos tratamentos pós-colheita com UV-C e ultrassom.

5 Referências

- Alothman, M., Bhat, R. & Karim, A. A. (2009). UV irradiation-induced changes of antioxidant capacity of fresh-cut tropical fruits. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 512-516.
- Amico, V., Napoli, E. M., Renda, A., Ruberto, G., Spatafora, C. & Tringali, C. (2004). Constituents of grape pomace from Sicilian cultivar 'Nerello Mascalese'. *Food Chemistry*, 88, 599-607.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproin: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.
- Bakker, J., Bridle, P. & Timberlake. (1986). Tristimulus measurements (CIELAB 76) of port wine colour. *Vitis*, 25, 67-78.
- Bakowska, A., Kucharska, A. Z. & Oszmianski, J. (2003). The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin-polyphenol copigment complex. *Food Chemistry*, 81, 349-355.
- Bhat, R., Sridhar, K.R., & Tomita-Yokotani, K. (2007). Effect of ionizing radiation on antinutritional features of velvet bean seeds (*Mucuna pruriens*). *Food Chemistry*, 103, 860-866.

- Boss, P. K., Davies, C. & Robinson, S. P. (1996). Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Molecular Biology*, 32, 565-569.
- Boudet, A. M. (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, 68, 2722-2735.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Burin, V. M., Ferreira-Lima, N. E., Panceri, C. P. & Bordignon-Luiz, M. T. (2014). Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of different extraction methods. *Microchemical Journal*, 114, 155-163.
- Cantos, E., Espín, J. C. & Tomás-Barberán, F. A. (2001). Postharvest induction modeling method using UV irradiation pulses for obtaining resveratrol-enriched table grapes: a new “functional” fruit?. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5052-5058.
- Cantos, E., Espín, J. C. & Tomás-Barberán, F. A. (2002). Postharvest stilbene-enrichment of red and White table grape varieties using UV-C irradiation pulses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6322-6329.
- Cantos, E., García-Viguera, C., Pascual-Teresa, S. & Tomás-Barberán, F. A. (2000). Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of Cv. Napoleon Table Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4606-4612.
- Cantos, E., Tomás-Barberán, T., Martínez, A. & Espín, J. C. (2003). Differential stilbene induction susceptibility of seven red wine grape varieties upon post-harvest UV-C irradiation. *European Food Research and Technology*, 217, 253-258.
- Chen, J. Y., Wen, P. F., Kong, W. F., Pan, Q. H., Wan, S. B. & Huang, W. D. (2006). Changes and subcellular localizations of the enzymes involved in phenylpropanoid metabolism during grape berry development. *Journal of Plant Physiology*, 163, 115-127.
- Chong, J., Poutaraud, A. & Huguene, P. (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science*, 177, 143-155.

- Corrales, M., García, A.F., Butz, P., & Tauscher, B. (2009). Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering*, 90, 415-421.
- Crozier, A.; Clifford, M. N.; Ashihara, H. (2006). *Plant secondary metabolites. Occurrence, structure and role in the human diet*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. 384p.
- Crupi, P., Pichierri, A., Basile, T. & Antonacci, D. (2013). Postharvest stilbenes and flavonoids enrichment of table grape cv Redglobe (*Vitis vinifera* L.) as affected by interactive UV-C exposure and storage conditions. *Food Chemistry*, 141, 802-808.
- Falguera, V., Garza, S., Pagán, A.,G., & Ibarz, A. (2013). Effect of UV-Vis Irradiation on Enzymatic Activities and Physicochemical Properties of Four Grape Musts from Different Varieties. *Food Bioprocess Technology*, 6, 2223-2229.
- Fava, J., Hodara, K., Nieto, A., Guerrero, S., Alzamora, S. M. & Castro, M. A. (2011). Structure (micro, ultra, nano), color and mechanical properties of *Vitis labrusca* L. (grape berry) fruits treated by hydrogen peroxide, UV-C irradiation and ultrasound. *Food Research International*, 44, 2938-2948.
- Fritzemeier, K. H. & Kindl, H. (1981). Coordinate induction by UV light of stilbene synthase, phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase in leaves of Vitaceae. *Planta*, 151, 48–52.
- Garrido, J. & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols — A chemical perspective. *Food Research International*, 54, 1844–1858.
- González-Barrio, R., Salmenkallio-Marttila, M., Tomás-Barberán, F. A., Cantos, E. & Espín, J. C. (2005). Etiology of UV-C-Induced browning in Var. Superior white table grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5990-5996.
- Guerrero, R. F., Puertas, B., Fernández, M. L., Palma, M. & Cantos-Villar, E. (2010a). Induction of stilbenes in grapes by UV-C: Comparison of different subspecies of *Vitis*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 231-238.
- Guerrero, R. F., Puertas, B., Fernández, M. I., Piñeiro, Z., Cantos-Villar, E. (2010b). UVC-treated skin-contact effect on both wine quality and resveratrol content. *Food Research International*, 43, 2179-2185.
- Guerrero-Beltrán, J. A., Welti-Chanes, J. & Barbosa-Cánovas, G. V. (2009). Ultraviolet-C light processing of grape, cranberry and grapefruit juices to

- inactivate *saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Food Processing Engineering*, 32, 916-932.
- Hasan, M.M., Yun, H-K., Kwak, E-J., & Baek, K-H. (2014). Preparation of resveratrol-enriched grape juice from ultrasonication treated grape fruits. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21, 729-734.
- Henrique, P. de C. (2015). *Radiação ultravioleta (UV-C) em sucos de uva integral*. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 110p.
- Hernández-Herrero, J. A. & Frutos, M. J. (2014). Colour and antioxidant capacity stability in grape, strawberry and plum peel model juices pHs and temperatures. *Food Chemistry*, 154, 199-204.
- Hopkinks, W. G.; Hüner, N. P. A. (2008). *Introduction to plant physiology*. 4th ed. Nova Jersey: John Wiley & Sons Inc. 503p.
- Jackman, R. L. & Stanley, D. W. (1995). Perspectives in the textural evaluation of plant foods. *Trends in Food Science & Technology*, 6, 187-194.
- Jeandet, P., Sbaghi, M., Bessis, R. & Meunier, P. (1995). The potential relationship of stilbene (resveratrol) synthesis to anthocyanin content in grape berry skins. *Vitis*, 34(2), 91-94.
- Katerova, Z., Todorova, D., Tasheva, K. & Sergiev, I. (2012). Influence of ultraviolet radiation on plant secondary metabolite production. *Genetics and Plant Physiology*, 2, 113-144.
- Keller, M.; Steel, C. C. & Creasy, G. L. (2000). Stilbene accumulation in grapevine tissues: Developmental and environmental effects. *Acta Horticulturae*, 514, 275-286.
- Lago-Vanzela, E. S., Da-Silva, R., Gomes, E., García-Romero, E. & Hermosín-Gutiérrez. (2011). Phenolic Composition of the Edible Parts (Flesh and Skin) of Bordô Grape (*Vitis labrusca*) Using HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 13136-13146.
- Lavola, A., Aphalo, P.J., Lahti, M., & Julkunen-Tiitto, R. (2003). Nutrient availability and the effect of increasing UV-B radiation on secondary plant compounds in Scots pine. *Environmental and Experimental Botany*, 49, 49-60.
- Lee, J., Durst, R. W. & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269-1278.

- Liu, W., Liu, C., Yang, C., Wang, L. & Li, S. (2010). Effect of grape genotype and tissue type on callus growth and production of resveratrols and their piceids after UV-C irradiation. *Food Chemistry*, 122, 475-481.
- Mazur, S. P., Nes, A., Wold, A. B., Remberg, S. F. & Aaby, K. (2014). Quality and chemical composition of ten red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes during three harvest seasons. *Food Chemistry*, 160, 233-240.
- Mazza, G. (1995). Anthocyanins in grape and grape products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35, 341-371.
- Murugesan, R., Orsat, V. & Lefsrud, M. (2012). Effect of pulsed ultraviolet light on the total phenol content of elderberry (*Sambucus nigra*) fruit. *Food and Nutrition Sciences*, 3, 774-783.
- Pala, Ç. & Toklucu, A. K. (2013). Effects of UV-C light processing on some quality characteristics of grape juices. *Food Bioprocess Technology*, 6, 719-725.
- Petersen, M.; Hans, J.; Matern, U. (2010). Biosynthesis of phenylpropanoids and related compounds. In: WINK, M. (ed) *Annual plant reviews v.40: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*, 2nd ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell. 445p.
- Pinelo, M., Arnous, A. & Meyer, A. S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 579-590.
- Pombo, M. A., Dotto, M. C., Martínez, G. A. & Civello, P. M. (2009). UV-C irradiation delays strawberry fruit softening and modifies the expression of genes involved in cell wall degradation. *Postharvest Biology and Technology*, 51, 141-148.
- Pombo, M. A., Rosli, H. G., Martínez, G. A. & Civello, P. M. (2011). UV-C treatment affects the expression and activity of defense genes in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*, Duch.) *Postharvest Biology and Technology*, 59, 94-102.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152-159.
- Rodrigo, R., Miranda, A. & Vergara, L. (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*, 412, 410-424.
- Rodrigues, E., Mariutti, L.R.B., & Mercadante, A.Z. (2013). Carotenoids and Phenolic Compounds from *Solanum sessiliflorum* na Unexploited Amazonian Fruit, and Their Scavenging Capacities against Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 3022-3029.

- Salah, N., Miller, N. J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G. P. & Rice-Evans, C. (1995). Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 322(2), 339-346.
- 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* (pp.445–498), 4th ed. Porto Alegre: Artmed.
- Segade, S. R., Rolle, L., Gerbi, V. & Orriols, I. (2008). Phenolic ripeness assessment of grape skin by texture analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 644-649.
- Siddhuraju, P., Osoniyi, O., Makkar, H.P.S., & Becker, K. (2002). Effect of soaking and ionising radiation on various antinutritional factors of seeds from different species of an unconventional legume, *Sesbania* and a common legume, green gram (*Vigna radiata*). *Food Chemistry*, 79, 273-281.
- Siemann, E. H. & Creasy, L. L. (1992). Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43(1), 49-52.
- Singleton, V. L. & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Spada, J. C., Noreña, C. P. Z., Marczak, L. D. F. & Tessaro, I. C. (2012). Study on the stability of β -carotene microencapsulated with pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch. *Carbohydrate Polymers*, 89, 1166-1173.
- Tiwari, B.K., Patras, A., Brunton, N., Cullen, P.J., O'Donnell, C.P. (2010). Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17, 598-604.
- Toaldo, I. M., Fogolari, O., Pimentel, G. C., Gois, J. S., Borges, D. L. G., Caliari, V. & Bordignon-Luiz, M. (2013). Effect of grape seeds on the polyphenol bioactive content and elemental composition by ICP-MS of grape juices from *Vitis labrusca* L. *LWT – Food Science and Technology*, 53, 1-8.
- Volf, I., Ignat, I., Neamtu, M. & Popa, V. I. (2014). Thermal stability, antioxidant activity, and photo-oxidation of natural polyphenols. *Chemical Papers*, 68(1), 121-129.

- Vom Endt, D., Kijne, J. W. & Mamelink, J. (2002). Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? *Phytochemistry*, *61*, 107-114.
- Xu, C., Zhang, Y., Cao, L. & Lu, J. (2010). Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. *Food Chemistry*, *119*, 1557-1565.
- Yang, Z., Zheng, Y., Cao, S., Tang, S., Ma, S. & Li, N. (2007). Effects of storage temperature on textural properties of Chinese bayberry fruit. *Journal of Texture Studies*, *38*, 166-177.
- Zhang, Z-Z., Li, X.-X., Chu, Y.-N., Zhang, M.-X., Wen, Y.-Q., Duan, C.-Q., & Pan, Q.-H. (2012). Three types of ultraviolet irradiation differentially promote expression of shikimate pathway genes and production of anthocyanins in grape berries. *Plant Physiology and Biochemistry*, *57*, 74-83.

CAPÍTULO 6
Considerações finais

6.1 Discussão geral

O Rio Grande do Sul é o maior produtor de uvas do país, e as variedades americanas e híbridas representam mais de 90% da produção, dentre as quais se destacam as variedades Isabel e Bordô. Em 2015 foram colhidas mais de 700 milhões de quilos de uva no estado, e desse total, 632,5 milhões de quilos são de variedades americanas e híbridas, dentre as quais a Isabel correspondeu a um total de 256,4 milhões de quilos e a Bordô 137,3 milhões de quilos (IBRAVIN, 2016). Parte da safra da uva é destinada para consumo *in natura*, mas uma grande parte dela é destinada para elaboração de produtos como vinhos e sucos. Para cada 100 litros de vinho fabricado, são produzidos aproximadamente 18 kg de bagaço (Rockenbach et al., 2011a), que é constituído em grande parte pela casca da uva, juntamente com as sementes. A escolha de trabalhar com a casca da uva se deu para que houvesse uma matéria-prima similar ao bagaço, visto que o trabalho de pesquisa diretamente com o subproduto se torna difícil devido à perecibilidade do material e a distância das zonas produtoras.

O primeiro objetivo deste trabalho foi extrair e encapsular compostos fenólicos das cascas destas duas variedades de uvas (Isabel e Bordô), a fim de aumentar a estabilidade dos mesmos. Para isso, primeiramente, através de testes, foi delineado um método de extração utilizando somente água acidificada com ácido cítrico, a fim de evitar o uso de solventes orgânicos.

No capítulo 2 foi apresentado um estudo da elaboração de micropartículas de extrato fenólico aquoso acidificado de casca de uva Isabel, onde foram elaborados pós utilizando o método de atomização com goma arábica, β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina como agentes encapsulantes, combinadas em concentrações máximas de 5%. A goma arábica é um dos materiais de parede mais utilizados na encapsulação de compostos alimentícios, entretanto, é interessante o estudo do uso de outros compostos como agentes encapsulantes. Além disso, um cuidado tomado na escolha dos agentes encapsulantes, é que todos os compostos utilizados fossem considerados prebióticos. As ciclodextrinas possuem a característica de formar um complexo de inclusão com as moléculas e são compostos com potencial para o encapsulamento de polifenóis. Dessa forma, optou-se por elaborar um tratamento com 5% de goma arábica e substituir de forma gradual parte desta pelas ciclodextrinas, pois devido à baixa solubilidade que apresenta é indicado seu uso até um máximo de 2,5% em solução (Ratnasooriya e

Rupasinghe, 2012). O tratamento elaborado com 3% de goma arábica e 2% de β -ciclodextrina foi o que resultou em maior retenção de flavonoides (67,2%), flavanols (51,1%), atividade antioxidante por DDPH (55%) e CUPRAC (58,8%), menor higroscopicidade (17,33%) e maior temperatura de transição vítrea (32,85 °C), conforme pode ser observado nas Tabelas 1, 2 e 4 do Capítulo 2. Os maiores valores para o conteúdo de fenóis e antocianinas monoméricas totais foram encontrados no tratamento elaborado com 5% de goma arábica. Entretanto, de forma geral os pós apresentaram alta higroscopicidade e baixa temperatura de transição vítrea, além da aglomeração das partículas, observada na microscopia eletrônica de varredura (Figura 1 do Capítulo 2), que são características indesejáveis em alimentos na forma de pó. A uva é uma fruta rica em açúcares que são altamente solúveis em água, solvente que foi utilizado na extração dos compostos fenólicos. Sendo assim, pode-se sugerir que boa parte dos açúcares presentes na casca foram extraídos juntamente com os compostos fenólicos, e que assim, a utilização de um total de 5% de material de parede não foi suficiente para aumentar a temperatura de transição vítrea e reduzir a higroscopicidade das amostras, resultando em micropartículas com a característica de absorver rapidamente a umidade do ambiente. Uma opção para melhorar essas características físicas nos pós seria aumentar o conteúdo total de agente encapsulante utilizado, o que foi feito no Capítulo 3, através do uso de um total de 10% de material de parede.

No capítulo 3 foi estudada a elaboração de micropartículas a partir do extrato fenólico da casca de uva Bordô, por atomização e liofilização, utilizando goma arábica, goma guar parcialmente hidrolisada e polidextrose. Aqui novamente se seguiu a ideia do capítulo anterior, de estudar agentes encapsulantes, considerados prebióticos, e alternativos à goma arábica. Foram obtidas altas retenções, maiores que 80% para fenóis totais e antocianinas monoméricas totais, e entre 45 e 84% para atividade antioxidante nos oito tratamentos elaborados, conforme pode ser observado na Tabela 1 do Capítulo 3. Nas Figuras 1 e 2 e na Tabela 3 do Capítulo 3, observa-se que os pós atomizados tiveram menor umidade, atividade de água e tamanho de partícula, maior solubilidade e temperatura de transição vítrea, além de melhores características morfológicas em relação aos pós liofilizados, o que é desejável, pois indica melhor qualidade e maior estabilidade do produto. Por outro lado, os pós liofilizados tiveram as menores higroscopicidades. O pó elaborado por atomização com 5% de goma guar parcialmente hidrolisada e 5% de polidextrose foi

considerado o melhor tratamento, visto que teve maior retenção de fenóis totais (89,0%), antocianinas monoméricas totais (99,5%) e atividade antioxidante por DPPH (57,3%) e CUPRAC (83,2%).

As micropartículas elaboradas com extrato fenólico de casca de uva Bordô (Capítulo 3) tiveram maiores conteúdos de compostos bioativos do que as micropartículas elaboradas a partir do extrato fenólico de uva Isabel (Capítulo 2). Isto pode ser atribuído ao fato de que a uva Bordô é uma das variedades de uva mais ricas em compostos fenólicos, o que é consequência dos conteúdos de fenóis totais dos extratos obtidos com essas duas variedades, sendo que o extrato da uva Isabel teve um total de 9,72 mg de ácido gálico por g de amostra em base seca, e da uva Bordô 26,26 mg de ácido gálico por g de amostra em base seca. Além disso, os pós obtidos com o extrato de uva Bordô tiveram características físicas melhores que os pós obtidos com o extrato de uva Isabel, e dessa forma, optou-se por prosseguir o estudo com a uva Bordô, utilizando o melhor tratamento elaborado no Capítulo 3 para avaliação da estabilidade.

O estudo da estabilidade dos pós é importante para a avaliação da viabilidade da utilização desses pigmentos como corantes ou antioxidantes em alimentos (Pitalua et al., 2010), assim como de seu comportamento frente à simulação da digestão gastrointestinal. Assim, no Capítulo 4 foi estudada a estabilidade das micropartículas elaboradas por atomização empregando 5% de goma guar parcialmente hidrolisada e 5% de polidextrose (que foi o melhor tratamento obtido no Capítulo 3), e de seu similar elaborado por liofilização. Para esse fim, foram realizados testes de armazenamento em condições aceleradas, utilizando umidades relativas de 75 e 90% e temperaturas de 35, 34 e 55 °C, para que o experimento pudesse ser realizado em um menor período de tempo, visto que produtos em pó tem uma vida útil longa. Posteriormente, foram estudadas também as estabilidades dos pós frente às condições de simulação da digestão gastrointestinal, a qual foi dividida em duas fases de avaliação: fase gástrica (primeira e segunda hora do experimento) e fase intestinal (terceira e quarta hora do experimento). Nos testes acelerados de armazenamento, houve redução significativa do conteúdo de polifenóis e na atividade antioxidante nos primeiros 7 dias de armazenamento, com posterior estabilização dos conteúdos. Entretanto, após 35 dias de armazenamento as micropartículas ainda apresentavam altas retenções dos teores: acima de 80% para o conteúdo de fenóis totais e de 39 a 60% da atividade antioxidante. Uma das

possíveis causas para as quedas no conteúdo de fenóis totais e na atividade antioxidante nos primeiros sete dias, pode ser a formação de microesferas durante o processo de encapsulamento. As microesferas são partículas formadas por uma fase contínua de um ou mais polímeros onde estão dispersas as partículas do composto de interesse (Mathiowitz, Kreitz, e Brannon-Peppas, 1999), e como não há a formação de uma parede bem definida, parte dos polifenóis podem ficar expostos ao ambiente, sendo degradados mais rapidamente do que os polifenóis que estão dispersos na partícula.

Para as antocianinas monoméricas totais as retenções após 35 dias variaram de 3,9 a 42,3%, e a perda de conteúdo com o tempo exibiu cinética de primeira ordem, que foi influenciada pela temperatura, umidade relativa e o tempo de armazenamento. Quanto aos dados cinéticos (Tabela 2, Capítulo 4), os valores de z e E_a indicaram que o pó liofilizado é menos estável às mudanças de temperatura, quando utilizadas temperaturas mais elevadas, entretanto, os valores de D e $t_{1/2}$ foram muito próximos entre os dois pós, o que indica pouca diferença de estabilidade entre eles nas temperaturas utilizadas neste estudo. Este resultado é corroborado pelas retenções finais, que foram significativamente maiores para o pó liofilizado em 35 °C, e não diferiram significativamente entre os pós nas duas outras temperaturas testadas (45 e 55 °C). A análise termodinâmica indicou que a degradação das antocianinas monoméricas se deu por uma reação não-espontânea e endotérmica. Foi observado (Figuras 2, 3 e 4 do Capítulo 4) que o conteúdo de antocianinas monoméricas totais reduziu de forma mais drástica quando comparado ao conteúdo de fenóis totais e à atividade antioxidante. Isto pode ser devido ao fato de que durante o armazenamento prolongado em temperaturas mais elevadas, parte da degradação dos polifenóis, dentre eles as antocianinas, ocorre por hidrólise ou polimerização das moléculas, formando novos compostos que podem compensar totalmente ou parcialmente as perdas de atividade antioxidante e conteúdo de polifenóis decorrente, principalmente, da redução do conteúdo de antocianinas monoméricas (Cao et al., 2012; Chang et al., 2006; Flores et al., 2014; Hager, Howard e Prior, 2008).

Os resultados da simulação da digestão gastrointestinal (Figura 5, Capítulo 4) indicaram que houve alta liberação de fenóis totais e de atividade antioxidante durante a fase gástrica ou ácida, nas duas primeiras horas de experimento, com um aumento significativo durante a fase intestinal, correspondente a terceira e quarta

horas do experimento. Na fase intestinal o pó atomizado teve liberação de 90,6% dos polifenóis liberados, enquanto o liofilizado teve 94,9%. Já para a atividade antioxidante as micropartículas elaboradas por atomização tiveram retenção de 69,4% da atividade antioxidante durante a fase intestinal, enquanto as liofilizadas tiveram 67,8%. Acredita-se que a liberação dos compostos fenólicos se deu através da solubilização da microcápsula, visto que os materiais de parede utilizados são altamente solúveis em água e de baixa digestibilidade no intestino delgado (Flood, Auerbach e Craig, 2004; Mudgil e Barak, 2013; Yoon, Chu e Juneja, 2008), não ocorrendo, assim, a hidrólise dos polímeros até a fase estudada. As antocianinas monoméricas totais apresentaram comportamento diferente, visto que apresentaram uma redução do seu conteúdo na fase intestinal, que pode ser atribuída ao pH alcalino do meio. Apesar da redução do conteúdo de antocianinas monoméricas totais na fase intestinal, o percentual de retenção da atividade antioxidante foi próximo a 70%, o que é um resultado promissor, visto que é nesta etapa do processo digestivo que os compostos fenólicos começam a ser absorvidos pelo organismo (Manach et al., 2004). Este comportamento foi semelhante ao observado na avaliação da estabilidade durante o armazenamento das micropartículas, e conforme citado anteriormente, ocorre devido à formação de novos compostos provenientes da hidrólise e polimerização dos compostos originais. Quanto ao uso de dois diferentes métodos de secagem, poucas diferenças foram encontradas entre eles durante o armazenamento em condições aceleradas e durante os testes de simulação da digestão gastrointestinal, e, sendo assim, pode-se dizer que a elaboração do pó atomizado se torna mais viável, devido ao menor custo e tempo requeridos para a produção.

Também foi conduzido um estudo para avaliação do tratamento pós-colheita com UV-C em uvas Bordô (Capítulo 5), com o intuito de aumentar o conteúdo de polifenóis totais nos frutos. Inicialmente o objetivo deste trabalho foi o emprego destes frutos tratados por UV-C na elaboração de microcápsulas. Entretanto, no primeiro experimento realizado na safra de 2013/2014, não houve aumento significativo dos teores de fenóis totais, antocianinas monoméricas totais e atividade antioxidante dos frutos submetidos à irradiação por 0,5, 1, 4, 10 e 30 minutos a uma potência de irradiação de 120 W, e armazenados por 24 e 48 horas, conforme pode ser visto na Figura 1 do Capítulo 5. Estudos com diversas variedades de uvas concluíram que o tratamento pós-colheita com UV-C utilizando potências de

irradiação entre 90 e 510 W resultaram no aumento de 2 a 10 vezes nos teores de fenóis, ou de resveratrol (Cantos et al., 2000; Cantos et al., 2003; Guerrero et al., 2010), resultado do aumento da atividade da enzima fenilalanina amônia liase. Por essa razão, devido aos resultados não esperados, o experimento foi modificado e repetido na safra 2014/2015, a fim de verificar se o aumento dos compostos fenólicos através do estresse por UV-C não se dava na variedade Bordô. Com base nos resultados obtidos na primeira safra, foram escolhidos os melhores tempos de irradiação (0,5 e 4 minutos), que foram repetidos de forma isolada ou combinados com tratamento em banho ultrassônico por 5 minutos, conforme a Tabela 1 do Capítulo 5. Além disso, o método de extração foi modificado, empregando-se um método de extração exaustiva, a fim de garantir que fosse alcançada a máxima extração dos compostos fenólicos. Os resultados indicaram que as uvas somente irradiadas por 0,5 minutos e as irradiadas por 4 minutos combinada com um tratamento em banho ultrassônico por 5 minutos, tiveram aumento significativo dos fenóis totais, antocianinas monoméricas totais e atividade antioxidante, após avaliação das mesmas nos tempos de 6, 24 e 48 horas de armazenamento (Figura 2, Capítulo 5). Os aumentos observados variaram de 1,2 a 2,0 vezes em relação ao controle nos diferentes tempos de armazenamento. Sendo assim, após estes estudos preliminares não foi possível afirmar se é viável a aplicação do tratamento pós-colheita com UV-C nas uvas Bordô. Uma das possíveis causas da diferença dos resultados encontrados nas duas safras pode ter sido o grau de maturação dos frutos, que é um dos fatores que influencia a biossíntese dos polifenóis. Estudos avaliando a aplicação de UV-C com uso de potências maiores que a utilizada neste estudo em uvas de diferentes graus de maturação deverão ser feitos para indicar se há a influência destes fatores na biossíntese de compostos fenólicos. Além disso, uma avaliação do perfil fenólico, a fim de verificar a variação dos compostos após a aplicação do tratamento e a verificação da atividade enzimática da enzima PAL serão necessários para avaliar essa viabilidade, visto que a aplicação do tratamento pós-colheita aumenta o tempo e o custo do processo.

CONCLUSÕES

- Foi possível elaborar micropartículas a partir de extrato fenólico aquoso de uva Isabel, utilizando goma arábica, β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina, em um total de 5% de material de parede, através do método de atomização. Os pós elaborados tiveram alta higroscopicidade, baixa temperatura de transição vítrea e presença de partículas aglomeradas, entretanto, altos conteúdos de compostos bioativos e atividade antioxidante. Foi verificado que o tratamento com 3% de goma arábica com 2% de β -ciclodextrina foi o que resultou em um pó com melhores propriedades.
- A elaboração de micropartículas atomizadas e liofilizadas a partir do extrato fenólico aquoso de uva Bordô utilizando goma arábica, goma guar parcialmente hidrolisada e polidextrose, em um total de 10% de material de parede, resultou em pós com retenção dos conteúdos de fenóis totais e antocianinas monoméricas totais acima de 80%. O pó atomizado com 5% de goma guar parcialmente hidrolisada e 5% de polidextrose teve as melhores retenções de fenóis totais, antocianinas monoméricas totais e atividade antioxidante por DPPH e CUPRAC. As micropartículas elaboradas por atomização apresentaram menor umidade, atividade de água e tamanho de partícula, maior temperatura de transição vítrea e solubilidade, além de melhores características morfológicas em relação às liofilizadas.
- As micropartículas elaboradas com 5% de goma guar parcialmente hidrolisada e 5% de polidextrose por atomização e liofilização apresentaram alta retenção do conteúdo de fenóis totais e atividade antioxidante durante o armazenamento em condições aceleradas, apesar da maior redução no conteúdo de antocianinas monoméricas totais. A simulação da digestão gastrointestinal apontou elevado percentual de fenóis totais e atividade antioxidante na fase intestinal, que é onde os compostos fenólicos começam a ser absorvidos no organismo.

- As uvas Bordô submetidas ao processo de irradiação em duas safras, apresentaram comportamentos diferentes, não sendo possível comprovar a viabilidade da aplicação deste tratamento para enriquecimento dos extratos de casca desta variedade de uva, através do aumento dos compostos fenólicos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho resultou em contribuições relevantes no campo da Ciência e Tecnologia de Alimentos, entretanto, abrem-se perspectivas de trabalhos futuros, que podem ser sintetizadas nas seguintes sugestões:

- Utilização de subprodutos obtidos diretamente da indústria de sucos e/ou vinhos, como o bagaço, para extração dos compostos fenólicos que serão encapsulados, com atenção para, se possível, utilização de resíduos de frutos de cultivo orgânico.
- Utilização de diferentes combinações de ciclodextrinas e goma arábica na elaboração de micropartículas de extrato fenólico de uva, totalizando percentuais maiores que 5%.
- Avaliação da eficiência de encapsulação e aplicação de técnicas de confirmação de encapsulamento, como TGA e DSC.
- Aplicação das micropartículas elaboradas por atomização com 5% de goma guar parcialmente hidrolisada e 5% de povidona em matrizes alimentícias, avaliando a viabilidade da utilização como ingrediente e a estabilidade dos compostos bioativos nas mesmas.
- Estudos para observar se o grau de maturação e a potência da irradiação UV-C aplicada nas uvas estão relacionados com a biossíntese de compostos fenólicos, através da aplicação de UV-C em potências mais altas que 120 W em uvas com diferentes graus de maturação. Além disso, verificar se ocorrem alterações na atividade da enzima PAL e no perfil fenólico dos frutos após aplicação dos tratamentos pós-colheita com UV-C e ultrassom.

REFERÊNCIAS

Adhikari, B.; Howes, T.; Bhandari, B.R.; Truong, V. Effect of addition of maltodextrin on drying kinetics and stickiness of sugar and acid-rich foods during convective drying: experiments and modeling. *Journal of Food Engineering*, v.62, p.53-68, 2004.

Adiotomre, J.; Eastwood, M.A.; Edwards, C.A.; Brydon, W.G. Dietary fiber: in vitro methods that anticipate nutrition and metabolic activity in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.52, n.1, p.128–134, 1990.

Alam, N.H.; Meier, R.; Sarker, S.A.; Bardhan, P.K.; Schneider, H.; Gyr, N. Partially hydrolysed guar gum supplemented comminuted chicken diet in persistent diarrhoea: a randomized controlled trial. *Archives of Disease in Childhood*, v.90. p.195-199, 2005.

Alves, C.Q.; David, J.M.; David, J.P.; Bahia, M.V.; Aguiar, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*, v.33, n.10, p.2202–2210, 2010.

Amendola, D.; Faveri, D.M. De; Spigno, G. Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts. *Journal of Food Engineering*, v.97, p.384-392, 2010.

Ancos, B.; González, E.M.; Cano, M.P. Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p.4565-4570, 2000.

Annison, G.; Trimble, R.P.; Topping, D.L. Feeding Australian acacia gums and gum arabic leads to non-Starch polysaccharide accumulation in the cecum of rats. *Journal of Nutrition*, v.125, n.2, p.283–292, 1995.

Aron, P.M.; Kennedy, J.A. Compositional investigation of phenolic polymers isolated from *Vitis vinifera* L. cv. Pinot Noir during fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p.5670–5680, 2007.

Azeredo, H.M.C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. *Alimentos e Nutrição*, v.16, n.1, p.89-97, 2005.

Bakar, J.; Muhammad, K.; Hashim, D.H.; Adzahan, N. Spray-Drying Optimization for Red Pitaya Peel (*Hylocereus polyrhizus*). *Food Bioprocess Technology*, v.6, p.1332-1342, 2013.

Bakowska-Barczak, A.M.; Kolodziejczyk, P.P. Black currant polyphenols: their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products*, v.34, p.1301-1309, 2011.

Bakowska, A.; Kucharska, A.Z.; Oszmianski, J. The effects of heating, UV irradiation, and storage stability of the anthocyanin-polyphenol copigment complex. *Food Chemistry*, v.81, p.349-355, 2003.

Balentine, D.A.; Wiseman, S.A.; Bouwnes, L.C. The chemistry of tea flavonoids. *Critical Review in Food and Science Nutrition*, v.37, p.693–704, 1997.

Barbosa-Cánovas, G.V.; Ortega-Rivas, E.; Juliano, P.; Yan, H. *Food Powders: Physical Properties, Processing, and Functionality*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005.

Bassa, I.A.; Francis, F.J. Stability of anthocyanins from sweet potatoes in a model beverage. *Journal of Food Science*, v.52, p.1753-1754, 1987.

Belo, G.M.S.; Diniz, A.S.; Pereira, A.P.C. Efeito terapêutico da fibra goma guar parcialmente hidrolisada na constipação intestinal funcional em pacientes hospitalizados. *Archives of Gastroenterology*, v.45(1), p.93-95, 2008.

Benavente-Garcia, O.; Castillo, J.; Marin, F.R.; Ortuno, A.; Del Rio, J.A. Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.45, p.505 – 4515, 1997.

Bhandari, B.R.; Howes, T. Implication of glass transition for the drying and stability of dried foods. *Journal of Food Engineering*, v.40, p.71-79, 1999.

Bilensoy, E.; Hincal, A.A. Recent advances and future directions in amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v.6, p.1161–1173, 2009.

Bobbio, F.O.; Mercadante, A.Z. Anthocyanins in foods: Occurrence and physicochemical properties. In Bobbio, F. O.; Mercadante; A. Z. *Food colorants: Chemical and functional properties*, Boca Raton: CRC Press, v.1, p.241–276, 2008.

Boudet, A.M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, v.68, p.2722-2735, 2007.

Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, v.56(11), p.317-333, 1998.

Breksa, A.P.; Takeoka, G.R.; Hidalgo, M.B.; Vilches, A.; Vasse, J.; Ramming, D.W. Antioxidant activity and phenolic content of 16 raisin grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars and selections. *Food Chemistry*, v.121, p.740-745, 2010.

Brouillard, R. Chemical structure of anthocyanins. In: *Anthocyanins as Food Colors*. Pericles Markakis (ed.), Academic Press Inc., New York, p.1-38, 1982.

Brouillard, R.; Chassaing, S.; Isorez, G.; Kueny-Stotz, M.; Figueiredo, P. The Visible Flavonoids or Anthocyanins. In: Santos-Buelga, C.; Escribano-Bailon, M.T.; Lattanzio, V. *Research to Applications, in Recent Advances in Polyphenol Research*, v.2, Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2010. 352p.

Brouillard, R.; Delaporte, B. Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration and tautomeric reaction of

malvidin 3-glucoside. *Journal of American Chemistry Society*, v.99, p.8461-8468, 1977.

Brouillard, R.; Dubois, J.R.M. Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. *Journal of the American Chemical Society*, v.99(5) p.1359-1364, 1977.

Burdock, G.A.; Flamm, W.G. A review of the studies of the safety of polydextrose in food. *Food and Chemical Toxicology*, v.37, p.233-264, 1999.

Burin, V.M.; Ferreira-Lima, N.E.; Panceri, C.P.; Bordignon-Luiz, M.T. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of different extraction methods. *Microchemical Journal*, v.114, p.155-163, 2014.

Burin, V.M.; Rossa, P.N.; Ferreira-Lima, N.E.; Hillmann, M.C.R.; Boirdignon-Luiz, M. T. Anthocyanins: optimisation of extraction from Cabernet Sauvignon grapes microcapsulation and stability in soft drink. *International Journal of Food Science and Technology*, v.46, p.186-193, 2011.

Camargo, U.A. *Uvas do Brasil*. Brasília: Embrapa - CNPUV, 1994. 90p. (Documentos 9).

Cantos, E.; Espín, J.C.; Tomás-Barberán, F.A. Postharvest induction modeling method using UV irradiation pulses for obtaining resveratrol-enriched table grapes: a new "functional" fruit? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, p.5052-5058, 2001.

Cantos, E.; García-Viguera, C.; Pascual-Teresa, S.; Tomás-Barberán, F.A. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of Cv. Napoleon Table Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p.4606-4612, 2000.

Cantos, E.; Tomás-Barberán, T.; Martínez, A.; Espín, J. C. Differential stilbene induction susceptibility of seven red wine grape varieties upon post-harvest UV-C irradiation. *European Food Research and Technology*, v.217, p.253-258, 2003.

Cao, X.; Bi, X.; Huang, W.; Wu, J.; Liao, X. Changes of quality of high hydrostatic pressure processed cloudy and clear strawberry juices during storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v.16, p.181-190, 2012.

Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernandez, M.L.; Paez-Hernandez, M.E.; Rodriguez, J.A.; Galan-Vidal, C.A. Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chemistry*, v.113, p.859-871, 2009.

Cavalcanti, R.N.; Santos, D.T.; Meireles, M.A.A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems – An overview. *Food Research International*, v.44, p.499-509, 2011.

Chalker-Scott, L. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and photobiology*, v.70(1), p.1-9, 1999.

Chang, Q.; Zuo, Z.; Chow, M.S.S.; Ho, W.K.K. Effect of storage temperature on phenolics stability in hawthorn (*Crataegus pinnatifida* var. major) fruits and a hawthorn drink. *Food Chemistry*, v.98, p.426-430, 2006.

Chaovanalikit, A.; Wrolstad, R.E. Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *Journal of Food Science*, v.69, p.FCT67-FCT72, 2004.

Cho, S.S.; Dreher, M.L. (Eds). *Handbook of dietary fiber*. New York: Marcel Dekker, 2001. 613p.

Cisse, M.; Vaillant, F.; Acosta, O.; Mayer, C.D.; Dornier, M. Thermal Degradation Kinetics of Anthocyanins from Blood Orange, Blackberry, and Roselle Using the Arrhenius, Eyring, and Ball Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, p.6285-6291, 2009.

Clifford, M.N. Anthocyanins: Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.80, p.1063–1072, 2000.

Craft, B.D.; Kerrihard, A.L.; Amarowicz, R.; Pegg, R.B. Phenol-Based Antioxidants and the *In Vitro* Methods Used for Their Assessment. *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety*, v.11, p.148-173, 2012.

Craig, S.A.S.; Holden, J.F.; Troup, J.P.; Auerbach, M.H.; Frier, H.I. Polydextrose as soluble fiber and complex carbohydrate. In: Cho, S.S.; Prosky, L.; Dreher, M. (Eds.), *Complex Carbohydrates in Foods*. New York: Marcel Dekker Inc., 1999. chap. 18. p.17-31.

Croft, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Science*, v.854, p.435-442, 1998.

Crozier, A.; Clifford, M.N.; Ashihara, H. *Plant secondary metabolites. Occurrence, structure and role in the human diet*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd., 2006. 384p.

Crupi, P.; Pichierri, A.; Basile, T.; Antonacci, D. Postharvest stilbenes and flavonoids enrichment of table grape cv Redglobe (*Vitis vinifera* L.) as affected by interactive UV-C exposure and storage conditions. *Food Chemistry*, v.141, p.802-808, 2013.

Cruz, J.M.; Conde, E.; Domínguez, H.; Parajó, J.C. Thermal stability of antioxidants obtained from wood and industrial wastes. *Food Chemistry*, v.100, p.1059-1064, 2007.

Davies, K.J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposia*, v.61, p.1-31, 1995.

Davies, K.J. An Overview of Oxidative Stress. *IUBMB Life*, v.50, p.241-244, 2000.

Davis, M.E.; Brewster, M.E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nature reviews Drug Discovery*, v.3, p.1023-1035, 2004.

Depypere, F.; Dewettinck, K.; Ronsse, F.; Pieters, J. Food powder microencapsulation: principles, problems and opportunities. *Applied Biotechnology Food Science and Policy*, v.1, n.2, p.75-94, 2003.

Desai, K.G.H.; Park, H. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying technology*, v.23, p.1361-1394, 2005.

Dey, P.M.; Harborne, J.B. *Plant phenolics methods in plant biochemistry*, 2^oed. London: Academic Press Limited, 1993.

Dou, J.; Meng, Y.; Liu, L.; Li, J.; Ren, D.; Guo, Y. Purification, characterization and antioxidant activities of polysaccharides from thinned-young apple. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.72, p.31-40, 2015.

Duangmal, K.; Apenten, R.K.O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). *Food Chemistry*, v.64, p.351-359, 1999.

Dubey, R.; Shami, T.C.; Rao, K.U.B. Microencapsulation Technology and Applications. *Defence Science Journal*, v.59(1), p.82-95, 2009.

Dziezak, J.D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technology*, v.42(4), p.136-151, 1988.

Endo, K.; Kumemura, M.; Nakamura, K.; Fujisawa, T.; Suzuki, K.; Benno, Y.; Mitsuoka, T. Effect of high cholesterol diet and polydextrose supplementation on the microflora, bacterial enzyme activity, putrefactive products, volatile fatty acid (VFA) profile, weight, and pH of the feces in healthy volunteers. *Bifidobacteria Microflora*, v.10(1), p.53-64, 1991.

Ezhilarasi, P.N.; Indrani, D.; Jena, B.S.; Anandharamakrishnan, C. Freeze drying technique for microencapsulation of *Garcinia* fruit extract and its effect on Bread quality. *Journal of Food Engineering*, v.117, p.513-520, 2013.

Fang, Z.; Bhandari, B. Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology*, v.21, p.510-523, 2010.

Fang, Z.; Bhandari, B. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*, v.129, p.1139-1147, 2011.

Faostat. FAO Statistical Database. Agriculture Data. Available in: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (Accessed on: 12 June 2014).

Favaro-Trindade, C.S.; Pinho, S.C.; Rocha, G.A. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.11(2), p.103-112, 2008.

Fathi, M.; Martín, A.; McClements, D.J. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, v.39, p.18-39, 2014.

Fernandes, L.R.; Xisto, M.D.; Penna, M.G.; Matosinhos, I.M.; Leal, M.C.; Portugal, L.R.; Leite, J.I.A. Efeito da goma guar parcialmente hidrolisada no metabolismo de lipídios e na aterogênese de camundongos. *Revista Nutrição*, v.19(5), p.563—571, 2006.

Ferrari, C.C.; Germer, S.P.M.; Alvim, I.D.; Vissotto, F.Z.; Aguirre, J.M. de. Influence of carrier agents on the physicochemical properties of blackberry powder produced by spray drying. *International Journal of Food Science and Technology*, v.47, p.1237-1245, 2012.

Figdor, S.K.; Rennhard, H.H. Caloric utilization and disposition of [¹⁴C] polydextrose in the rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.29, p.1181-1189, 1981.

Flickr – Photo Sharing. Disponível em: <<https://www.flickr.com>>. Acesso em 11 ago. 2014.

Flood, M.T.; Auerbach, M.H.; Craig, S.A.S. A review of the clinical toleration studies of polydextrose in food. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 1531-1542.

Flores, F.P.; Singh, R.K.; Kong, F. Physical and storage properties of spray-dried blueberry pomace extract with whey protein isolate as wall material. *Journal of Food Engineering*, v.137, p.1-6, 2014.

Fossen, T.; Carbita, L; Andersen, Ø.M. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry*, v.63(4), p.435–440, 1998.

Francis, F.J. Food colorants: anthocyanins. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, v.28, p.273-314, 1989.

Fraga, C.G. *Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition and pharmacology*. New Jersey: Wiley & Sons, 2009. 593p.

Fritzemeier, K.H.; Kindl, H. Coordinate induction by UV light of stilbene synthase, phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase in leaves of Vitaceae. *Planta*, v.151, p.48–52, 1981.

Gawel, R. Red wine astringency: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, v.4, p.74-95, 1998.

Gibbs, B.F.; Kermasha, S.; Ali, I.; Mulligan, C.N. Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Science and Nutrition*, v.50, p.213–224, 1999.

Gibson, G.R.; Roberfroid, M.B. Dietary modulation of the human colonie microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, v.125(6), p.1401-1412, 1995.

Giusti, M.M.; Wrolstad, R.E., Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, v.14, p.217–225, 2003.

Glover, D.A.; Ushida, K.; Phillips, A.O.; Riley, S.G. Acacia (sen) SUPERGUM™ (Gum Arabic): An evaluation of potential health benefits in human subjects. *Food Hydrocolloids*, v.23, p.2410-2415, 2009.

González-Barrio, R.; Salmenkallio-Marttila, M.; Tomás-Barberán, F.A.; Cantos, E.; Espín, J.C. Etiology of UV-C-Induced browning in Var. Superior white table grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.5990-5996, 2005.

Gould, S.; Scott, R.C. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): A toxicology review. *Food and Chemical Toxicology*, v.43, p.1451-1459, 2005.

Guerrero, R.F.; Liazid, A.; Palma, M.; Puertas, B.; González-Barrio, R.; Gil-Izquierdo, A.; García-Barroso, C.; Cantos-Villar, E. Phenolic characterisation of red grapes autochthonous to Andalusia. *Food Chemistry*, v.4, p.74-95, 2009.

Guerrero, R.F.; Puertas, B.; Fernández, M.L.; Palma, M.; Cantos-Villar, E. Induction of stilbenes in grapes by UV-C: Comparison of different subspecies of *Vitis*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v.11, p.231-238, 2010.

Hager, T.J.; Howard, L.R.; Prior, R.L. Processing and Storage Effects on Monomeric Anthocyanins, Percent Polymeric Color, and Antioxidant Capacity of Processed Blueberry Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.58, p.689-695, 2008.

Haidong, L.; Fang, Y.; Zhihong, T.; Changle, R. Study on preparation of β -cyclodextrin encapsulation tea extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.49, p.561-566, 2011.

Halliwell, B. Antioxidants and human disease: A general introduction. *Nutrition Reviews*, v.55, p.S44-S52, 1997.

Hamama, A.A.; Nawar, W.W. Thermal decomposition of some phenolic antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.39, p.1063-1069, 1991.

Han, X; Shen, T; Lou, H. Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, v.8, p.950-988, 2007.

Harada, A.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H. Cyclodextrin-based supramolecular polymers. *Chemical Society Reviews*, v.38, p.875–882, 2009.

Hasan, M.M.; Baek, K.H. Induction of resveratrol biosynthesis in grape skins and leaves by ultrasonication treatment. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, v.31(4), P.496-502, 2013.

Hasan, M.M.; Yun, H.K.; Kwak, E.J.; Baek, K.H. Preparation of resveratrol-enriched grape juice from ultrasonication treated grape fruits. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.21, p.729-734, 2014.

He, J.; Giusti, M.M. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science Technology*, v.1, p.163-187, 2010.

Heinonen, I.M.; Meyer, A.S.; Frankel, E.N. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, p.4107-4112, 1998.

Hermes-Lima, M.; Storey, J.M.; Storey, K.B. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, v.120, p.437-448, 1998.

Hopkins, W.G.; Hüner, N.P. A. *Introduction to plant physiology*. 4th ed. Nova Jersey: John Wiley & Sons Inc. 503p.

Hufnagel, J.C.; Hofmann, T. Orosensory-Directed Identification of Astringent Mouthfeel and Bitter-Tasting Compounds in Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, p.1376-1386, 2008.

Hwang, D.C.; Damodaran, S. Selective precipitation and removal of lipids from cheese whey using chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.43, p.33-37, 1995.

Iacopini, P.; Baldi, M.; Storchi, P.; Sebastiani, L. 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 – Instituto Brasileiro do Vinho. A vitivinicultura Brasileira. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br>>. Acesso em: 10 set. 2014.

IBRAVIN – Instituto Brasileiro do Vinho. Safra da uva 2015 é 16% maior em volume em relação ao ano passado. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br>>. Acesso em: 17 mar. 2016.

Jie, Z.; Bang-yao, L.; Ming-jie, X.; Hai-wei, L.; Zu-kang, Z.; Ting-song, W.; Craig, S. A.A. Studies of the effects of polydextrose intake on physiologic functions in Chinese people. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.72, p.1503-1509, 2000.

Jiménez, N.; Bohuon, P.; Dornier, M.; Bonazzi, C.; Pérez, A.M.; Vaillant, F. Effect of water activity on anthocyanin degradation and browning kinetics at high temperatures (100-140°C). *Food Research International*, v.47, p.106-115, 2012.

Jiménez-Aguilar, D.M.; Ortega-Regules, A.E.; Lozada-Ramírez, J.D.; Pérez-Pérez, M.C.I.; Vernon-Carter, E.J.; Welti-Chanes, J. Color and chemical stability of spray-dried blueberry extract using mesquite gum as wall material. *Journal of Food Composition*, v.24, p.889-894, 2011.

Kalogeropoulos, N.; Yannakopoulou, K.; Gioxari, A.; Chiou, A.; Makris, D.P. Polyphenol characterization and encapsulation in β -cyclodextrin of a flavonoid-rich *Hypericum perforatum* (St John's wort) extract. *LWT – Food Science and Technology*, v.43, p.882-889, 2010.

Kapoor, M.P.; Juneja, L.R. Partially Hydrolyzed Guar Gum Dietary Fiber. In: Cho, S.S.; Samuel, P. (Eds.), *Fiber Ingredients: Food Applications and Health Benefits*. Boca Raton: CRC Press, 2009. chap. 6. p.79-120.

Katalinic, V.; Mozina, S.S.; Skroza, D.; Generalic, I.; Abramovic, H.; Milos, M.; Ljubenkovic, I.; Piskernik, S.; Pezo, I.; Terpin, P.; Boban, M. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia. *Food Chemistry*, v.119, p.715-723, 2010.

Kaur, C.; Kapoor, H. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, v.36, p.703-725, 2001.

KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Phenylpropanoid biosynthesis - Reference pathway. Disponível em: <<http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00940.html>>. Acesso em: 27 jan. 2013.

Kishimoto, A.; Ushida, K.; Phillips, G.O.; Ogasawara, T.; Sasaki, Y. Identification of intestinal bacteria responsible for fermentation of gum arabic in pig model. *Current Microbiology*, v.53(3), p.173–177, 2006.

Kuo, D.C.; Hsu, S.P.; Chien, C.T. Partially hydrolyzed guar gum supplement reduces high-fat diet increased blood lipids and oxidative stress and ameliorates FeCl₃-induced acute arterial injury in hamsters. *Journal of Biomedical Science*, v.16(15), p.1-10, 2009.

Lago-Vanzela, E.S.; Da-Silva, R.; Gomes, E.; García-Romero, E.; Hermosín-Gutiérrez, I. Phenolic Composition of the Edible Parts (Flesh and Skin) of Bordô Grape (*Vitis labrusca*) Using HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.59, p.13136-13146, 2011.

Laine, P.; Kylli, P.; Heinonen, M.; Jouppila, K. Storage stability of microencapsulated cloudberry (*Rubus chamaemorus*) phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, p.11251-11261, 2008.

Larrauri, J.A.; Rupérez, P.; Saura-Calixto, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.45, p.1390-1393, 1997.

Lima, V.,L.,A.,G. de; Guerra, N.,B. Antocianinas: Atividade Antioxidante e Biodisponibilidade. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, n.37, p.121-128, 2003.

Lima, M.S.; Silani, I.S.V.; Toaldo, I.M.; Corrêa, L.C.; Biasoto, A.C.T.; Pereira, G.E.; Bordignon-Luiz, M.T.; Ninow, J.L. Phenolic compounds, organic acids and

antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil. *Food Chemistry*, v.161, p.94-103, 2014.

Liu, W.; Liu, C.; Yang, C.; Wang, L.; Li, S. Effect of grape genotype and tissue type on callus growth and production of resveratrols and their piceids after UV-C irradiation. *Food Chemistry*, v.122, p.475-481, 2010.

Liu, Z.-q.; Zhou, J.-h.; Zeng, Y.-l.; Ouyang, X.-l. The enhancement and encapsulation of *Agaricus bisporus* flavor. *Journal of Food Engineering*, v.65, p.391-396, 2004.

Lloyd, R.V.; Hanna, P.M.; Mason, R.P. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radical Biology & Medicine*, v.22(5), p.885-888, 1997.

Luca, A.; Cilek, B.; Hasirci, V.; Sahin, S.; Sumnu, G. Storage and baking stability of encapsulated sour cherry phenolic compounds from micro- and nano- suspensions. *Food and Bioprocess Technology*, v.7, p.204-211, 2012

Lucas-Abellán, C.; Fortea, I.; Gabaldón, J.A.; Núñez-Delicado, E. Encapsulation of quercetin and myricetin in cyclodextrins at acidic pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, p.255-259, 2008.

Maia, J.D.G.; Camargo, U.A. *Sistema de produção de uvas rústicas para processamento em regiões tropicais do Brasil*. Embrapa Uva e Vinho – Sistemas de Produção, n.9, 2005.

Malgarim, M.B.; Tibola, C.S.; Ferri, V.C.; Zaicovsk, C.B.; Manfroi, V. Características de qualidade do vinho Bordô elaborado com diferentes processos de vinificação e períodos de maceração. *Acta Scientiarum Technology*, v.28(2), 2006.

Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.79, p.727-747, 2004.

Mantegna, S.; Binello, A.; Boffa, L.; Giorgis, M.; Cena, C.; Cravotto, G. A one-pot ultrasound-assisted water extraction/cyclodextrin encapsulation of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. *Food Chemistry*, v.130, p.746-750, 2012.

Martineau, L.C.; Couture, A.; Spoor, D.; Benhaddou-Andaloussi, A.; Harris, C.; Meddah, B.; Leduc, C.; Burt, A.; Vuong, T.; Mai, P.L.; Prentki, M.; Bennett, S.A.; Arnason, J.T.; Haddad, P.S. Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait. *Phytomedicine*, v.13, p.612–623, 2006.

Mathew, A.G.; Parpia, H.A.B. Food browning as a polyphenol reaction. *Advances in Food Research*, v.29, p.75-145, 1971.

Mathiowitz, E.; Kreitz, M.; Brannon-Peppas, L. Microencapsulation. In: Mathiowitz, E. (ed). *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*, v.2., 1st ed. Wiley, 1999. Pp. 493-553.

Mazza, G.; Brouillard, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chemistry*, v.25, p.207-225, 1987.

Mebane, R.C.; Rybolt, T.R.. Edible acid-base indicators. *Journal of Chemical Education*, v.62, n.4, p.285, 1985.

Medina-Torres, L.; García-Cruz, E.E.; Calderas, F.; Laredos, R.F.G.; Sánchez-Olivares, G.; Gallegos-Infante, J.A.; Rocha-Guzmán, N.E.; Rodríguez-Ramírez, J. Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (*Opuntia ficus indica*). *LWT – Food Science and Technology*, v.50, p.642-660, 2013.

Mahfoudhi, N.; Hamdi, S. Kinetic degradation and storage stability of β -carotene encapsulated by freeze-drying using almond gum and gum Arabic as wall materials. *Journal of Food Processing and Preservation*, p.1-11, 2014.

Mercader-Ros, M.T.; Lucas-Abellán, C.; Fortea, M.I.; Gabaldón, J.A.; Núñez-Delgado. Effect of HP- β -cyclodextrins complexation on the antioxidant activity of flavonols. *Food Chemistry*, v.118, p.769-773, 2010.

Michel, C.; Kravtchenko, T.P.; David, A., Gueneau, S.; Kozłowski, F.; Cherbut, C. In vitro prebiotic effects of Acacia gums onto the human intestinal microbiota depends on both botanical origin and environmental pH. *Anaerobe*, v.4(6), p.257–266, 1998.

Miletic, T.; Kyriakos, K.; Graovac, A.; Ibrić, S. Spray-dried voriconazole-cyclodextrin complexes: Solubility, dissolution rate and chemical stability. *Carbohydrate Polymers*, v.98, p.122-131, 2013.

Monagas, M.; Bartolome, B.A.; Gomez-Cardove, C. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.45, p.85-118, 2005.

Mudgil, D.; Barak, S. Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.61, p.1-6, 2013.

Nawar, W.F. Lipids. In: Fennema, O. (Ed.). *Food chemistry*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, Inc. p 225–320, 1996.

Neto, C.C. Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Molecular Nutrition & Food Research*, v.51, p.652-664, 2007.

Nicholson, R.L.; Hammerschmidt, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, v.30, p.369-380, 1992.

Nixdorf, S.L.; Hermosín-Gutiérrez, I. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: phenolic composition and antioxidant capacity. *Analytica Chimica Acta*, v.659, p.208–215, 2010.

Obreque-Slier, E.; Peña-Neira, A.; López-Solís, R.; Zamora-Marín, F.; Ricardo-Da Silva, J. M.; Laureano, O. Comparative Study of the Phenolic Composition of Seeds

an Skins from Carménere and Cabernet Sauvignon Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) during Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.58, p.3591-3599, 2010.

OIV - Organisation Internationale de la Vigne et du Vine. Vine and wine outlook 2008–2009. OIV – 18. Belgique: Peters SA [ISBN 979-10-91799-08-9. Available from: <<http://www.oiv.int/oiv/info/esplublicationoiv>> Accessed 11.2013.

Okubo, T.; Ishihara, N.; Takahashi, H.; Fujisawa, T.; Kim, M.; Yamamoto, T.; Mitsuoka, T. Effects of partially hydrolyzed guar gum intake on human intestinal microflora and its metabolism. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.58(8), p.1364-1369, 1994.

Okuro, P.K.; Thomazini, M.; Balieiro, J.C.C.; Liberal, R.D.C.O.; Fávaro-Trinadade, C.S. Co-encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. *Food Research International*, v.53, p.96-103, 2013.

Oliveira, D.M.; Bastos, D.H.M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Química Nova*, v.34(6), 2011.

Parisi, G.; Bottona, E.; Carrara, M.; Cardin, F.; Faedo, A.; Goldin, D.; Marino, M.; Pantalena, M.; Tafner, G.; Verdianeli, G.; Zilli, M.; Leandro, G. Treatment effects of partially hydrolyzed guar gum on symptoms and quality of life of patients with irritable bowel syndrome. A multicenter randomized open trial. *Digestive Disiases and Sciences*, v.50(6), p.1107-1112, 2005.

Perron, N.R.; Brumaghim, J.L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys*, v.53, p.75-100, 2009.

Petersen, M.; Hans, J.; Matern, U. Biosynthesis of phenylpropanoids and related compounds. In: Wink, M. (ed) *Annual plant reviews v.40: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*, 2nd ed., Oxford, UK: Wiley, 2010. 445p.

Phillips, G.O.; Ogasawara, T.; Ushida, K. The regulatory and scientific approach to defining gum Arabic (*Acacia senegal* and *Acacia seyal*) as a dietary fibre. *Food Hydrocolloids*, v.22, p.24-35, 2008.

Phillips, G. O.; Williams, P. A. (Eds). *Handbook of hydrocolloids*. 2nd ed. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 2009. 901p.

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

Pinto, S.S.; Fritzen-Freire, C.B.; Benedetti, S.; Murakami, F.S.; Petrusa, J.C.C.; Prudêncio, E.S.; Amboni, R.D.M.C. Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect *Bifidobacterium*-BB-12 microencapsulated by spray drying. *Food Research International*, v.67, p.400-408, 2015.

- Pitalua, E.; Jimenez, M.; Vernon-Carter, E.J.; Beristain, C.I. Antioxidative activity of microcapsules with beetroot juice using gum Arabic as wall material. *Food and Bioproducts Processing*, v.88, p.253-258, 2010.
- Pombo, M.A.; Rosli, H.G.; Martínez, G.A.; Civello, P.M. UV-C treatment affects the expression and activity of defense genes in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*, Duch.). *Postharvest Biology and Technology*, v.59, p.94-102, 2011.
- Poshadri, A.; Kuna, A. Microencapsulation technology: a review. *Journal of Research ANGRAU*, v.38(1), p.86-102, 2010.
- Pridham, J.B. *Phenolics in Plants in Health and Disease*, New York: Pergamon Press, 1960.
- Prior, R.L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *American Journal of Clinical Nutrition* v.78(3), Suppl: 570S-8S, 2003.
- Probert, H.M.; Apajalahti, J.H.A.; Rautonen, N.; Stowell, J.; Gibson, G.R. Polydextrose, lactitol, and fructo-oligosaccharide fermentation by colonic bacteria in a three-stage continuous culture system. *Applied and Environmental Microbiology*, v.70(8), p.4505-4511, 2004.
- Puupponen-Pimiä, R.; Nohynek, L.; Meier, C.; Kähkönen, M.; Heinonen, M.; Hopia, A. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, v.90, p.494-507, 2001.
- Raninem, K.; Lappi, J.; Mykkänen, H.; Poutanen, K. Dietary fiber type reflects physiological functionality: comparison of grain fiber, inulin and polydextrose. *Nutrition Reviews*, v.69(1), p.9-21, 2011.
- Ratnasooriya, C.C.; Rupasinghe, V. Extraction of phenolic compounds from grapes and their pomace using β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, v.134, p.625-631, 2012.
- Ratti, C. Hot air freeze-drying of high-value foods: a review. *Journal of Food Engineering*, v.49, p.311-319, 2001.
- Rekhy, R.; McConchie, R. Promoting consumption of fruit and vegetables for better health. Have campaigns delivered on the goals? *Appetite*, v.79, p.113-123, 2014.
- Reyes, L.F.; Cisneros-Zevallos, L. Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple- and red-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Food Chemistry*, v.100, p.885-894, 2007.
- Ribeiro, C.; Zimeri, J.E.; Yildiz, E.; Kokini, J.L. Estimation of effective diffusivities and glass transition temperature of polydextrose as a function of moisture content. *Carbohydrate Polymers*, v.51, p.273-280, 2003.
- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Papaganda, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, v.20, p.933-956, 1996.

Rizzon, L.A.; Link, M. Composição do suco de uva caseiro de diferentes cultivares. *Ciência Rural*, v. 36(2), p.689-692, 2006.

Robert, P.; Gorena, T.; Romero, N.; Sepulveda, E.; Chavez, J.; Saenz, C. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science and Technology*, v.45, p.1386-1394, 2010.

Rockenbach, I.I.; Rodrigues, E.; V.M.; Gonzaga, L.V.; Genovese, M.I.; Gonçalves, A.E.S.S.; Fett, R. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chemistry*, v.127, p.174-179, 2011a.

Rockenbach, I.I.; Gonzaga, L.V.; Rizelio, V.M.; Gonçalves, A.E.S.S.; Genovese, M.I.; Fett, R. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. *Food Research International*, v.44, p.897-901, 2011b.

Rombaldi, C.V.; Bergamasqui, M.; Lucchetta, L.; Zanuzo, M.; Silva, J. A. Produtividade e qualidade de uva, cv. Isabel, em dois sistemas de produção. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.26(1), p.89-91, 2004.

Rosa, C.G.; Borges, C.D.; Zambiasi, R.C.; Nunes, M.R.; Benevenuto, E.V.; Luz, S.R.; D'ávila, R.F.; Rutz, J.K. Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β -cyclodextrin and xanthan. *Industrial Crops and Products*, v.46, p.138-146, 2013.

Rosa, C.G.; Borges, C.D.; Zambiasi, R.C.; Rutz, J.K.; Luz, S.R.; Krumreich, F.D.; Benvenuto, E.V.; Nunes, M.R. Encapsulation of the phenolic compounds of the blackberry (*Rubus fruticosus*). *LWT – Food Science and Technology*, v.58, p.527-533, 2014.

Ryan, P.; Hynes, M.J. The kinetics and mechanisms of the complex formation and antioxidant behavior of the polyphenols EGCg and ECG with iron (III). *Journal of Inorganic Biochemistry*, v.101, p.585-593, 2007.

Sanchez, V.; Baeza, R.; Galmarini, M.V.; Zamora, M.C.; Chirife, J. Freeze-Drying Encapsulation of Red Wine Polyphenols in an Amorphous Matrix of Maltodextrin. *Food Bioprocess Technology*, v.6, p.1350-1354, 2013.

Sancho, M.I.; Gasull, E.; Blanco, S.E.; Castro, E.A. Inclusion complex of 2-chlorobenzophenone with cyclomaltoheptaose (β -cyclodextrin): temperature, solvent effects and molecular modeling. *Carbohydrate Research*, v.346, p.1978-1984, 2011.

Sangita, S.; Vik, S.A.; Pakseresht, M.; Kolonel, L.N. Adherence to recommendations for fruit and vegetable intake, ethnicity and ischemic heart disease mortality. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, v.23, p.1247-1254, 2013.

Sansone, F.; Picerno, P.; Mencherini, T.; Villecco, F.; D'Ursi, A.M.; Aquino, R.P.; Lauro, M.R. Flavonoid microparticles by spray-drying: Influence of enhancers of the

dissolution rate on properties and stability. *Journal of Food Engineering*, v.103, p.188–196, 2011.

Santas, J.; Espadaler, J.; Cuñé, J.; Refecas, M. Partially Hydrolyzed Guar Gums Reduce Dietary Fatty Acid and Sterol Absorption in Guinea Pigs Independent of Viscosity. *Lipids*, v.47, p.697-705, 2012.

Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, v.130(8) (Supplemental), p.2073S-2085S, 2000.

Serrano-Cruz, M.R.; Villanueva-Carvajal, A.; Rosales, E.J.M.; Dávila, J.F.R.; Dominguez-Lopez, A. Controlled release and antioxidant activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract encapsulated in mixtures of carboxymethyl cellulose, whey protein and pectin. *LWT – Food Science and Technology*, v.50, p.554-561, 2013.

Shahidi, F.; Han, X.Q. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.33, n.6, p.501-547, 1993.

Shahidi, F.; Naczk, M. *Phenolics in food and nutraceuticals*. Flórida, EUA: CRC Press, Boca Raton, 2004. 576p.

Shahidi, F.; Wanasundara, P.K.J.P.D.. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.32, p.67-103, 1992

Sheng, J.; Sun, Y. Antioxidant properties of different molecular weight polysaccharides from *Athyrium multidentatum* (Doll.) Ching. *Carbohydrate Polymers*, v.108, p.41-45, 2014.

Siemann, E.H.; Creasy, L.L. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, v.43(1), p.49-52, 1992.

Sies, H. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*, v.25(12), p.1058-1071, 1986.

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

Simón, B.F.; Hernández, T.; Estrella, I. Phenolic composition of white grapes (Var. Airen). Changes during ripening. *Food Chemistry*, v.47, p.47-53, 1993.

Sólyom, K.; Solá, R.; Cocero, M.J.; Mato, R.B. Thermal degradation of grape marc polyphenols. *Food Chemistry*, v.159, p.361-366, 2014.

Souza, J.S.I.; Martins, F.P. *Viticultura brasileira: principais variedades e suas características*. Piracicaba: FEALQ, 2002. 368p.

Souza, V.B.; Thomazini, M.; Balieiro, J.C.C.; Fávoro-Trindade, C.S. 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, p.39-50, 2015.

Sri, J.S.; Seethadevi, A.; Prabha, K.S.; Muthuprasanna, P.; Pavitra, P. Microencapsulation: a review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, v.3(1), p.509-531, 2012.

Stella, V.J.; He, Q. Cyclodextrins. *Toxicologic Pathology*, v.36, p.30-42, 2008.

Suave, J.; Dall'agnol, E.C.; Pezzin, A.P.T.; Silva, D.A.K.; Meier, M.M.; Soldi, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. *Revista saúde e ambiente*, v.7(2), p.12-20, 2006.

Szejtli, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews*, v.98(5), p.1743-1753, 1998.

Szente, L.; Szejtli, J. Cyclodextrin as food ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, v.15, p.137-142, 2004.

Tagliazucchi, D.; Verzelloni, E.; Bertolini, D.; Conte, A. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, v.120, p.599-606, 2010.

Taiz, L.; Zeiger, F. *Fisiologia Vegetal*. 3^{ed}. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

Takahashi, H.; Yang, S.I.; Hayashi, C.; Kim, M.; Yamanaka, J.; Yamamoto, T. Effect of partially hydrolyzed guar gum on fecal output in human volunteers. *Nutrition Research*, v.13, p.649-657, 1993.

Takahashi, H.; Wako, N.; Okubo, T.; Ishihara, N.; Yamanaka, J.; Yamamoto, T. Influence of partially hydrolyzed guar gum on constipation on women. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v.40, p.251-159, 1994.

Tarko, T.; Duda-Chodak, A.; Sroka, P.; Satora, P.; Michalik, J. Transformations of Phenolic Compounds in an *in vitro* Model Simulating the Human Alimentary Tract. *Food Technology and Biotechnology*, v.47, p.456-463, 2009.

Tarko, T.; Duda-Chodak, A.; Zajac, N. Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by in vitro simulation methods. A review. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, v.64, p.79-84, 2013.

Taylor, A.H. Encapsulation systems and their applications in the flavor industry. *Food Flavor Ingredients Packaging and Processing*, v.5(9), p.48-51, 1983

Thakur, B.R.; Arya, S. S. Studies on stability of blue grape anthocyanins. *International Journal of Food Science and Technology*, v.24, p.321-326, 1989.

Tiwari, B.K.; Patras, A.; Brunton, N.; Cullen, P.J.; O'Donnell, C.P. Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.17, p.598-604, 2010.

- Toaldo, I.M.; Fogolari, O.; Pimentel, G.C.; Gois, J.S.; Borges, D.L.G.; Caliari, V.; Bordignon-Luiz, M. Effect of grape seeds on the polyphenol bioactive content and elemental composition by ICP-MS of grape juices from *Vitis labrusca* L., *LWT – Food Science and Technology*, v.53, p.1-8, 2013.
- Tonon, R.V.; Brabet, C.; Pallet, D.; Brat, P.; Hubinger, M.D. Physicochemical and morphological characterization of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. *International Journal of Food Science and Technology*, v.44, p.1950-1958, 2009.
- Tonon, R.V.; Brabet, C.; Hubinger, M.D. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*, v.43, p.907-914, 2010.
- Torres, C. de; Díaz-Maroto, M.C.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Pérez-Coello, M.S. Effect of freeze-drying and oven-drying on volatiles and phenolics composition of grape skin. *Analytica Chimica Acta*, v.660, p.177-182, 2010.
- Torres, C. de; Schumacher, R.; Alañón, M.E.; Pérez-Coello, M.S.A.; Díaz-Maroto, M.C. Freeze-dried grape skins by-products to enhance the quality of White wine from neutral grape varieties. *Food Research International*, v.69, p.97-105, 2015.
- Toyokuni, S. Iron and carcinogenesis: from Fenton reaction to target genes. *Redox Report*, v.7(4), p.189-197, 2002.
- Truong, V.; Bhandari, B.R.; Howes, T. Optimization of co-current spray drying process of sugar-rich foods. Part I – Moisture and glass transition temperature profile during drying. *Journal of Food Engineering*, v.71, p.55-65, 2005.
- Tsuda, K.T.; Inden, K.; Yamanaka, J.; Ikeda, Y. Effect of partially hydrolyzed guar gum on elevation of blood glucose after sugar intake in human volunteers. *Journal of Japanese Association for Dietary Fiber*, v.2, p.15–22, 1998.
- Türkben, C.; Sariburun, E.; Demir, C.; Uylaser, V. Effect of freezing and frozen storage on phenolic compounds of raspberry and blackberry cultivars. *Food Analytical Methods*, v.3, p.144-153, 2010.
- Uekama, K.; Hirayama, F.; Irie, T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. *Chemical Reviews*, v.98, p.2045-2076, 1998.
- Umer, H.; Nigam, H.; Tomboli, A.M.; Nainar, M.S.M. Microencapsulation: Process, Techniques and Applications. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, v.2(2), p.474-481, 2011.
- Ustundag, G.; Kuloglu, Z.; Kirbas, N.; Kansu, A. Can partially hydrolyzed guar gum be an alternative to lactulose in treatment of childhood constipation? *The Turkish Journal of Gastroenterology*, v.21(4), p.360-364, 2010.
- Valle, E.M.M del. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, v.39, p.1033-1046, 2004.

Velázquez, M.; Davies, C.; Marett, R.; Slavin, J.L.; Feirtag, J.M. Effect of oligosaccharides and fibre substitute on short-chain fatty acid production by human faecal microflora. *Anaerobe*, v.6, p.87-92, 2000.

Vom Endt, D.; Kijne, J.W.; Mamelink, J. Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? *Phytochemistry*, v.61, p.107-114, 2002.

Vos, P.; Faas, M.M.; Spasojevic, M.; Sikkema, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, v.20, p.292-302, 2010.

Vuong, T.; Benhaddou-Andaloussi, A.; Brault, A.; Harbilas, D.; Martineau, L.C.; Vallerand, D.; Ramassamy, C.; Matar, C.; Haddad, P.S. Antiobesity and antidiabetic effects of biotransformed blueberry juice in KKAY mice. *International Journal of Obesity*, p.1-8, 2009.

Wang, H.; Cao, G.; Prior, R.L. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.44, p.701-705, 1996.

Wang, J.; Cao, Y.; Sun, B.; Wang, C. Characterisation of inclusion complex of *trans*-ferulic acid and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, v.124, p.1069-1075, 2011.

Wang, H.; Shi, Y.; Le, G. Rapid microwave-assisted synthesis of polydextrose and identification of structure and function. *Carbohydrate Polymers*, v.113, p.225-230, 2014.

Wang, S. Y.; Jiao, H. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p.5672- 5676, 2000.

Wargovich, M.J. Anticancer properties of fruits and vegetables. *HortScience*, v.35(4), p. 573-575, 2000.

Welch, C.R.; Wu, Q.; Simon, J.E. Recent advances in anthocyanin analysis and characterization. *Current Analytical Chemistry*, n.4(2), p.75-101, 2008.

Wink, M. *Annual Plant Reviews, Volume 40: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. 2nd ed. Wiley-Blackwell, 2010. 445p.

Xu, C.; Zhang, Y.; Cao, L.; Lu, J. Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. *Food Chemistry*, v.119, p.1557-1565, 2010.

Yoon, S.J.; Chu, D.C.; Juneja, L.R. Chemical and physical properties, safety and application of partially hydrolyzed guar gum as dietary fiber. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, v.42, p.1-7, 2008.

Yoon, S.-J.; Chu, D.-C.; Juneja, L.R. Chemical and Physical Properties, Safety and Application of Partially Hydrolyzed Guar Gum as Dietary Fiber. *Journal of Clinical Biochemistry Nutrition*, v.42, p.1-7, 2008.

Yoruk, R.; Marshall, M.R. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *Journal of Food Biochemistry*, v.27, p.361-422, 2003.

Zhao, Y. *Berry fruit: value-added products for health promotion*. EUA: CRC Press, 2007. p. 4-45.

APÊNDICE A

Artigo em processo de publicação na Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos.

Evaluation of the growth of enterobacteria in fructooligosaccharides using the principal components analysis

Running title: Evaluation of the growth of enterobacteria

Abstract

Experimental data obtained from the literature concerning the growth rate of 35 different enterobacteria and acidification of the media using various carbohydrates as the substrates (glucose and the fructooligosaccharides Profeed P95, Raftilose P95 and Raftiline LS), were submitted to a multivariate statistical analysis of the principal components and clusters. The objective was to evaluate the degree of correlation between the substrates and the microorganisms, grouping them according to their affinities. When the growth rates of the enterobacteria were evaluated, strong correlation was observed between the substrates composed of short chain fructose oligosaccharides (Profeed P95 and Raftilose P95). The microorganisms could be separated into four groups, similarities being found between enterobacteria of the same genus and/or species. With respect to acidification of the medium, strong correlation was observed between glucose and Profeed, which have a greater percentage of glucose units in the chain. However, it was found poor correlation among microorganisms from the same genus and/or species, as well as between the enterobacteria species and fermentation of the carbohydrates.

Key-words: principal component analysis; cluster analysis; enterobacteria; fructooligosaccharides.

INTRODUCTION

Fructans are linear or branched fructose polymers which may or may not have a D-glucose residue, which is usually located at the extremity and connected by an α -1,2 bond (HENDRY; WALLACE, 1993). Fructans are classified according to the type of glycosidic bond (POLLOCK *et al.*, 1996), and can be divided into three groups: inulin, levan and graminan (SMITH, 1993). Inulin is a mixture of oligomers and polymeric chains with a variable number of fructose molecules that generally having a terminal glucose molecule (VILLEGAS; COSTELL, 2007), and has a polymerization degree varying between 2 and 60 with an average degree of 12 (GIBSON; ROBERFROID, 1995; TÁRREGA; ROCAFULL; COSTELL, 2010). Inulin have some related compounds, namely oligofructose and

fructooligosaccharides (FOS), differentiated by the degree of polymerization of the molecule (MEYER *et al.*, 2011), that is less than 10 (DREVON; BORNET, 1992). FOS are present in several crops, such as yacon (CASTRO *et al.*, 2013) and onion (KUMAR; PRASHANTH; VENKATESH, 2015).

Commercial FOS can be produced in two main ways: by the extraction and enzymatic hydrolysis of inulin, which can produce linear compounds of fructose units, with or without a glucose residue at the extremity of the chain, such as Raftilose P95 and Raftiline LS, or by the enzymatic transfructosilation of sucrose, producing compounds with only glucose residues, such as Profeed P95 (HARTEMINK; VAN LAERE; ROMBOUTS, 1997).

The use of prebiotic fibres in foods with the aim of modulating the gut microbiota is important, because they might induce either increase or decrease of the production of health compounds, which are related with the production of bacterial metabolites, growth of health promoting bacteria, decrease in intestinal pathogens, or immune modulation (AL-SHERAJI *et al.*, 2013). FOS are not digested by the enzymes in the human intestine, and thus reach the colon untouched when ingested, where they are fermented by part of the microbiota present, liberating short chain fatty acids and gases (WANG; GIBSON, 1993).

The bacteria responsible for fermenting the FOS can be divided into three main groups: the first group is benefic, consisting of the bifidobacteria, lactobacilli and other lactic bacteria, all bacteria of positive value for human health; the second group consists of the enterobacteria and clostridia, considered to be negative to human health; and the third group consists of other bacteria denominated as neutral (MITSUOKA, 1990). Thus some pathogenic bacteria can compete with the bifidobacteria for the FOS.

Different studies using pathogens can be realized by observing the growth of these bacteria using fructooligosaccharides as substrate (HARA *et al.*, 1994; LINKE *et al.*, 2013; MAO *et al.*, 2015; VAN LAERE *et al.*, 2000). However, the use of a large number of different bacteria and fructooligosaccharides can generate a large amount of data that may complicate the interpretation of results. The multivariate statistical analysis is a group of techniques that permits the simultaneous evaluation of diverse variables, aiming to quantify the correlation between them and hence extract information invisible in the original data, making it possible to eliminate the unimportant variables (HAIR *et al.*, 2009; LUCHESA, 2004).

The principal component analysis is one of the techniques belonging to the multivariate analysis group (SHARMA, 1996). This analysis consists essentially of reducing the dimensionality of a data group constituted of a large number of interrelated variables, maintaining as much as possible of the variation of the data group (JOLLIFFE, 2002). This is

done by transforming the data group into a new group of variables denominated as principal components (PC), which are not co-related and are obtained in decreasing order of maximum variance, that is, the first principal component (PC1) retains more statistical information than the second principal component (PC2) (NETO; MOITA, 1998; JOLLIFFE, 2002). The reduction in dimensionality occurs in this way, since the principal components obtained generally possess 90% or more of the information contained in a great number of variables (NETO; MOITA, 1998).

The principal component analysis is often used as an intermediate technique for reducing the size of data, which commonly uses another type of analysis simultaneously (JOLLIFFE, 2002). The Cluster analysis is one of the most frequently used analysis along with the PCA, and its basic goal discovers samples groupings within a data set, i.e., it evaluates the similarity between samples, measuring the distances between the measurement points and space, where similar samples will be close together, while different samples are far from each other (LAVINE, 2000).

Thus the objective of the present study was to apply the Principal Component Analysis and the Cluster Analysis to data obtained from experiments carried out with a large number of variables, so as to evaluate the degree of correlation between the microorganisms and carbohydrates tested and group the microorganisms according to the degree of correlation between them.

MATERIAL AND METHODS

Table 1 shows the different species of enterobacteria used by Hartemink, Van Laere and Rombouts (1997) to study the possible degradation and fermentation of commercial fructooligosaccharides, their growth rate and the final pH of the medium. The microorganisms after incubation were transferred to the following substrates: glucose, Profeed P95®, Raftilose P95® and Raftiline LS® and non-supplemented medium for comparative purposes (HARTEMINK; VAN LAERE; ROMBOUTS, 1997). The results of growth rates of the enterobacteria and the final pH values of the media supplemented with the different carbohydrates after cultivation of each of the microorganisms used in that study were submitted to multivariate analysis. Principal Components Analysis (PCA) were used in order to reduce the number of variables and identify similarities among the samples, where the results might be reduced to two principal components (PCs) denominated first principal component (PC1) and second principal component (PC2) (SHARMA, 1996; JOLLIFFE, 2002). The SAS 9.3 statistical pack was used to perform the PCA analysis (Sharma, 1996),

where they obtained the data of Pearson correlation, and other data used for the preparation of correlation charts in STATISTICA 7.0 statistical pack. Finally, a cluster analysis (CA) was applied to the resulting data. A hierarchical clustering was used, with Centroid method where the similarity between two clusters is the distance between their centroids. The Cluster analysis, including the dendrograms used, was made in the statistical software SAS 9.3 according to Sharma (1996).

Table 1 – Different species of enterobacteria used by Hartemink, Van Laere and Rombouts (1997) to study the possible degradation and fermentation of commercial fructooligosaccharides, growth rates (V_{\max} , $\Delta\text{O.D. h}^{-1}$) of the enterobacteria and pH values after 24 hours of incubation in 1/2PY medium, supplemented with 1.0% (w/v) of different supplements*.

Species	Strain	None	Supplement			
			Glucose	Raftilose P95	Profeed P95	Raftiline LS
<i>Enterobacter cloacae</i>	27	0.159; 6.6**	0.339; 5.5	0.247; 5.7	0.262; 5.4	0.233; 6.4
<i>E. coli</i>	85	0.168; 6.7	0.377; 4.4	0.386; 6.0	0.407; 4.4	0.326; 6.5
<i>E. coli</i>	114	0.162; 6.8	0.284; 4.8	0.236; 5.4	0.229; 5.3	0.171; 6.5
<i>E. coli</i>	120	0.104; 6.8	0.199; 4.3	0.211; 5.8	0.203; 4.4	0.175; 6.4
<i>E. coli</i>	121	0.179; 6.9	0.363; 4.6	0.336; 5.8	0.329; 4.8	0.251; 6.2
<i>E. coli</i>	122	0.195; 6.8	0.446; 4.4	0.424; 5.6	0.453; 4.5	0.347; 6.3
<i>E. coli</i>	129	0.126; 6.8	0.272; 4.3	0.281; 5.8	0.281; 4.4	0.229; 6.6
<i>E. coli</i>	130	0.185; 6.6	0.292; 4.8	0.288; 6.0	0.287; 4.6	0.211; 6.3
<i>E. coli</i>	139	0.199; 6.4	0.445; 4.4	0.469; 5.5	0.458; 4.5	0.355; 6.1
<i>E. coli</i>	260	0.195; 6.6	0.328; 4.8	0.263; 6.2	0.276; 4.7	0.203; 6.4
<i>E. coli</i>	269	0.124; 6.9	0.251; 4.4	0.268; 5.5	0.265; 4.7	0.218; 6.3
<i>E. coli</i>	22	0.141; 6.8	0.176; 4.7	0.160; 6.3	0.161; 4.6	0.146; 6.4
<i>E. coli</i>	23	0.178; 6.8	0.278; 4.8	0.233; 5.9	0.259; 5.0	0.122; 6.3
<i>E. coli</i>	24	0.121; 6.6	0.328; 5.0	0.224; 5.9	0.293; 5.1	0.116; 6.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	21	0.176; 6.8	0.293; 4.2	0.282; 5.2	0.292; 4.5	0.261; 5.8
<i>Proteus vulgaris</i>	20	0.147; 7.0	0.292; 6.0	0.289; 5.5	0.315; 5.7	0.270; 5.9
<i>S. brandenburg</i>	14	0.109; 6.9	0.308; 4.5	0.198; 5.4	0.230; 4.5	0.189; 6.6
<i>S. breamy</i>	15	0.132; 7.2	0.175; 4.7	0.173; 5.4	0.223; 4.9	0.167; 6.4
<i>S. heidelberg</i>	9	0.113; 6.8	0.377; 4.6	0.259; 5.6	0.276; 4.8	0.145; 6.7
<i>S. infantis</i>	7	0.109; 7.3	0.275; 4.7	0.227; 5.4	0.200; 5.3	0.142; 6.7
<i>S. montevideo</i>	16	0.164; 6.9	0.331; 4.7	0.236; 6.2	0.253; 4.6	0.197; 6.4
<i>S. newport</i>	19	0.102; 6.7	0.164; 4.5	0.149; 5.4	0.184; 4.8	0.134; 6.2
<i>S. oranienburg</i>	17	0.147; 7.2	0.324; 4.4	0.243; 5.5	0.275; 5.1	0.163; 6.7
<i>S. typhimurium</i>	18	0.076; 6.9	0.323; 4.4	0.173; 5.5	0.218; 4.5	0.111; 6.4
<i>S. typhimurium</i>	13	0.099; 7.1	0.340; 4.7	0.176; 5.4	0.238; 4.5	0.120; 6.3
<i>Serratia liquefaciens</i>	4	0.129; 6.8	0.203; 5.5	0.174; 6.1	0.203; 5.5	0.167; 6.5
<i>Shigella dysenteriae</i>	29	0.101; 6.8	0.269; 4.6	0.106; 6.2	0.126; 5.3	0.102; 6.5
<i>Shigella flexneri</i>	28	0.110; 6.8	0.221; 5.0	0.195; 6.1	0.225; 6.0	0.149; 6.5
<i>Yersinia enterocolitica</i>	25	0.105; 6.8	0.197; 4.3	0.216; 5.7	0.230; 4.4	0.204; 6.5
<i>Yersinia enterocolitica</i>	26	0.069; 6.7	0.141; 4.9	0.117; 5.7	0.149; 5.2	0.169; 6.2

* Data obtained from Hartemink, Van Laere and Rombouts (1997).

** Data: Growth rates; pH

RESULTS AND DISCUSSION

Growth

From the values obtained for the Pearson's correlation coefficients shown in Table 2, it can be seen that with respect to the growth rates of the microorganisms, the largest correlation coefficients were found between Raftilose P95 and Profeed P95 (0.97), Raftiline LS and Raftilose P95 (0.86) and between Raftiline LS and Profeed P95 (0.82), where values close to 1 were found. Considering that these three substrates were constituted basically of fructooligosaccharides, this result appears to conform to the expected result of having correlation between these substrates.

Table 2 - Pearson's correlation coefficients between the substrates for the growth rates of the bacteria.

	None	Glucose	Raftilose P95	Profeed P95	Raftiline LS
None	1.00000				
Glucose	0.56447	1.00000			
Raftilose P95	0.77720	0.65893	1.00000		
Profeed P95	0.74541	0.66209	0.97184	1.00000	
Raftiline LS	0.65630	0.52527	0.86386	0.82423	1.00000

The stronger correlation presented between Raftilose P95 (95% oligosaccharides connected by β -2,1 bonds) and Profeed P95 (95% short chain oligosaccharides) can be justified by the fact that these two substrates are constituted of fructose oligosaccharides, that is by short chain molecules with a polymerization degree of 2 to 8, and of 3 to 5, respectively. On the other hand, Raftiline LS contains oligosaccharides and polysaccharides (92%), that is, much larger molecules with a polymerization degree between 2 and 60. Thus, according to Hartemink, Van Laere and Rombouts (1997), Raftiline LS was not degraded or was degraded much slower by all the species. This way, although an increase in growth rate, there was no reduction in the pH value. It is important to observe that the formation of products which, in this case, would be responsible for the reduction in pH value, may or may not be associated with microbial growth, that is, in some cases the formation of products is less directly related with the growth process (BORZANI; LIMA; AQUARONE, 1975; CASABLANCAS; SANTÍN, 1998).

Other authors reported that bacteria with prebiotic activity had better growth rates with fructooligosaccharide than with inulin (MEULEN; AVONTS; VUYST, 2004; ROSSI *et al.*, 2005; STEWART; TIMM; SLAVIN, 2008).

The principal components analysis resulted in two principal components: PC1 (78.56%) and PC2 (10.38%), which together represented 88.94% of the total variability of the data. Figure 1A shows the two principal components, PC1 being more related to Profeed P95 and Raftilose P95, or when additional carbohydrates were not added to the medium. On the other hand, PC2 was high for glucose and negative for the other substrates. The correlation between Profeed P95 and Raftilose P95 can be observed again, in the same way as observed for the Pearson's correlation coefficients.

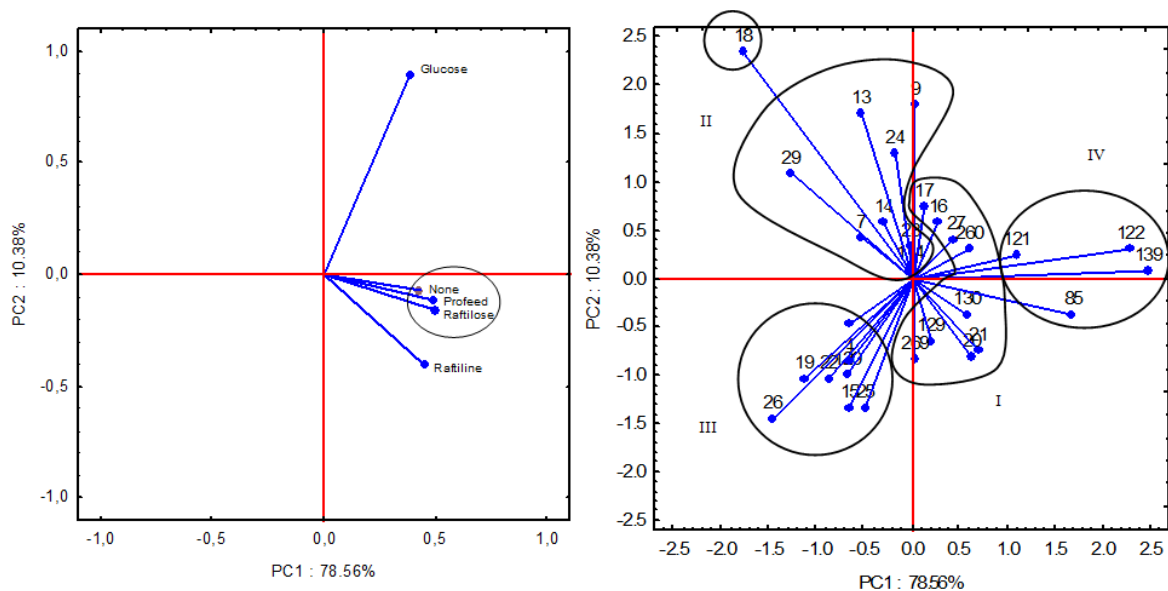


Figure 1 - Loading plot of PC1–PC2 for the substrates for the bacterial growth rates (A) and Score plot and Groups (I, II, III and IV) created by principal component analysis, taking into account the correlation observing between the microorganisms evaluated in relation to their growth rates in media containing different supplements (B).

When the relationship between the microorganisms tested in the experiment was evaluated with respect to the values obtained for the growth rates (Figure 1B) they could be placed in four groups (I, II, III and IV), with one microorganism separate from these groups (*Salmonella typhimurium* E-18).

In the cluster analysis, which is shown in the dendrogram (Figure 2), the formation of these groups, which were observed in the principal components analysis, was confirmed. In this

dendrogram hierarchical grouping has been used in order to establish similarities among the different types of bacteria, whose names of each microorganism that correspond to each number of strain is shown in Table 1. For both clusters and biplots, the smallest distances represent the greatest similarities, showing that the bacteria in the same group were strongly correlated.

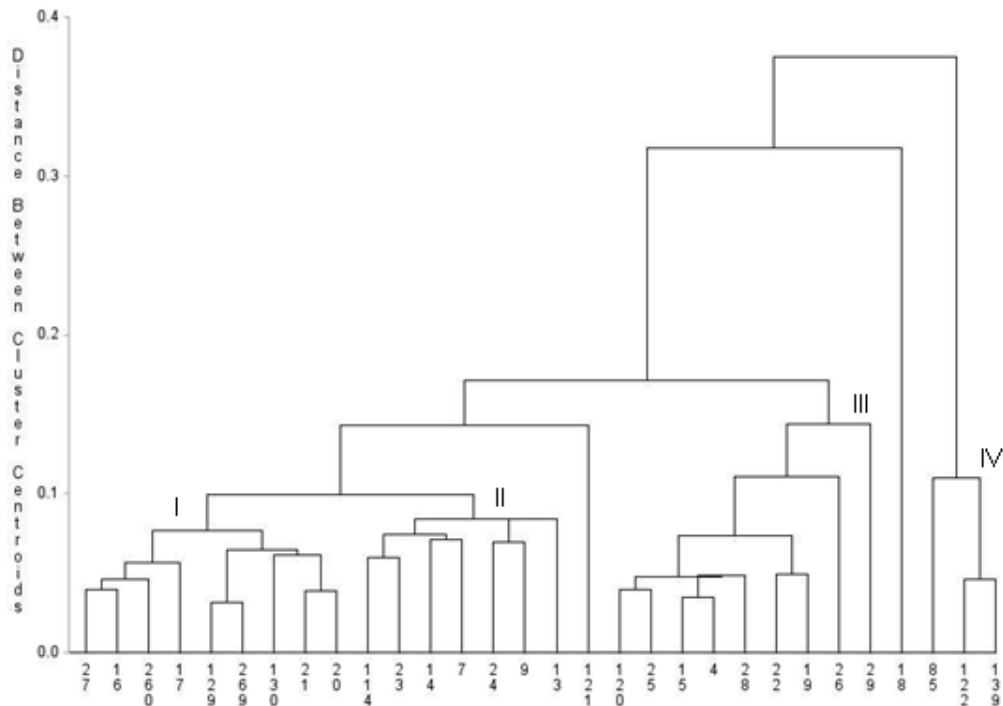


Figure 2 - Dendrogram of the clusters of microorganisms according to their growth rates in culture media supplemented with different carbohydrates.

In general it can be seen that the principal components analysis and the cluster analysis, allowed for the grouping of microorganisms of similar species based on their growth rates, allowing for an evaluation of the results from a different aspect. It is important to observe that a total of 13 strains of *Escherichia coli*, 2 strains of *Yersinia enterocolitica*, 9 species of the genus *Salmonella* and 2 of the genus *Shigella* were tested. In addition to these, the following 4 microorganisms were also tested: *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* and *Serratia liquefaciens*. The first group (I) included three bacterial genera in which only one species was tested: *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Proteus*. In addition to correlating amongst themselves, *E. coli* and *Salmonella* species were also present. In the third group, in addition to the presence of *E. coli*, *Salmonella* and *Serratia*, two strains of *Y. enterocolitica* and two species of *Shigella* were also present.

It could be said there were similarities between the growth rates of bacteria from the same genus, even though some of the *E. coli* strains and different *Salmonella* species evaluated, which corresponded to a great number of microorganisms, were distributed amongst the groups, showing stronger or less strong correlations according to the strain. This result is satisfactory since it is to be expected that microorganisms from the same genus present similar behaviors due to their similar metabolisms. Nevertheless, differences exist, since each microorganism has a characteristic mean duplication time, related to its specific growth rate and the limitations of the medium (CASABLANCAS; SANTÍN, 1998).

The use of the principal components analysis as a tool to group microorganisms according to their growth rates can be clearly seen in the groups formed, starting with group IV where the bacteria showing the highest growth rates can be found. The bacteria in group I showed the second highest growth rates, followed by those in group II, with the exception of *S. heidelberg* E-9, whose growth rate was closer to those of group I.

It is known that FOS are compounds that are not digested by the human organism and thus arrive intact in the colon, where they are mainly degraded by the bifidobacteria present, thus favoring their development (MOLIS *et al.*, 1996; SCHNEEMAN, 1999). These organisms are benefic since they compete with pathogenic bacteria. Hartemink, Van Laere and Rombouts (1997) showed that the enterobacteria growth in the media supplemented with FOS, although it is important to note that for the majority of the bacteria, the growth rate was lower in FOS than in glucose alone.

Eigenvectors data is an important tool to better evaluate the relationship between carbohydrates and bacteria used in the study. The eigenvectors give the weights that are used for forming the equation to compute the new variables (PC1 and PC2) (SHARMA, 1996). Therefore, the first principal component (PC1) is the most important component, because correspond to 78.56% of the total variance of data. The equation for PC1 is:

$$\begin{aligned} Prin1 = & 0.188 \times none + 0.389 \times glucose + 0.587 \times Raftilose\ P95 + 0.564 \times Profeed\ P95 \\ & + 0.389 \times Raftiline\ LS \end{aligned}$$

As can be seen, the rate growth of the enterobacteria in the presence of Raftilose P95 and Profeed P95 accounts for a substantial portion (30 and 28% respectively) of total variance. Thus, we can assume that only one principal component is the most important in order to measure the growth rate (78.56%).

The equation indicates the PC1 value though a weighted sum of the growth rate, is strongly affected by the presence of Raftilose P95 (0.587) and Profeed P95 (0.564). Thus, PC1 values suggest that *E.coli* 139 had the highest growth rate, and in the other hand, *Hafnia alvei* E-1 and *Shigella dysenteriae* E-29 had the lower growth rates.

Acidification

Table 3 shows the Pearson's correlation coefficients between the final pH values after 24 hours of incubation with the microorganisms. It can be seen that the strongest correlation was found between Profeed P95 and glucose (0.75). This strong correlation could be due to the fact that a comparison of the chemical compositions of the two substrates shows that Profeed P95 is composed of one unit of glucose and two, three or four of fructose, that is, a relatively high proportion of glucose in relation to the fructose. On the other hand, Raftilose P95 only has glucose units bonds at the extremities of some chains, and Raftiline LS has glucose units linked at all the extremities but with a polymerization degree of from 2 to 60, that is, with the presence of large chains that cause a reduction in the proportion of glucose in the medium.

Table 3 - Pearson's correlation coefficients between the substrates for the final pH values after 24 hours incubation with the bacteria.

	None	Glucose	Raftilose P95	Profeed P95	Raftiline LS
None	1.00000				
Glucose	-0.02571	1.00000			
Raftilose P95	-0.36745	0.20706	1.00000		
Profeed P95	0.14742	0.75111	0.12074	1.00000	
Raftiline LS	0.24948	-0.15291	0.24219	0.06952	1.00000

From the principal components analysis (Figure 3A) of the results obtained for the pH values, it can be seen that 36.35% of the variability in the data could be explained by principal component 1 (PC1), which was characterized by a correlation between Profeed P95 and glucose, whereas the second principal component (PC2), which described 27.35% of the variability was high when the medium was not supplemented. Thus it can be seen that the behavior observed for the Pearson's correlation coefficients was repeated in the PCA.

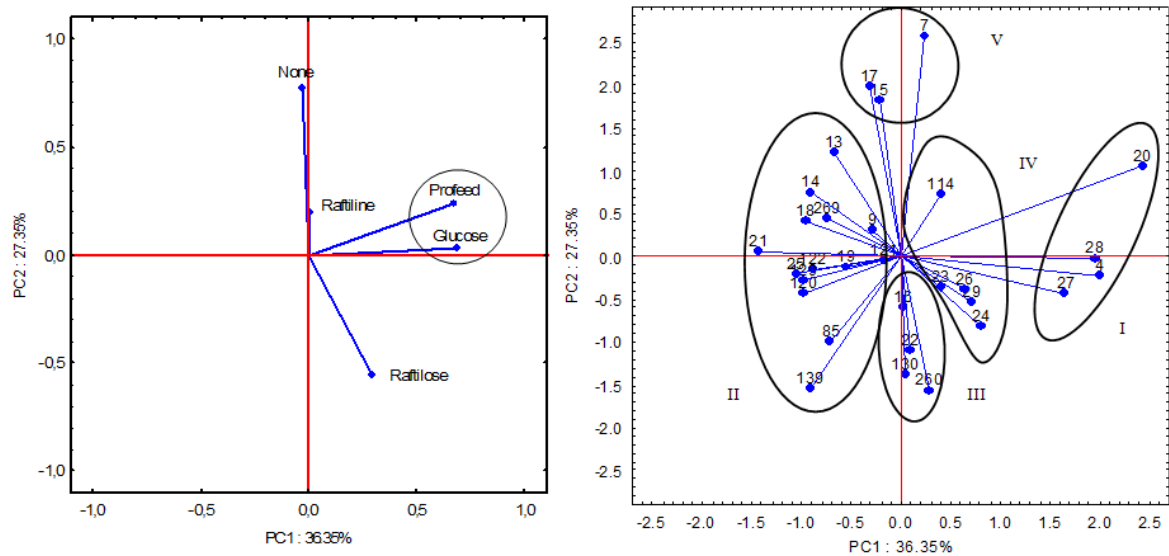


Figure 3 - Loading plot of PC1–PC2 for the substrates for the final pH value after 24 hours incubation with the bacteria (A) and Score plot and Groups (I, II, III, IV and V) created by principal component analysis the microorganisms studied for the final pH of the media after 24 hours of incubation (B).

With respect to the correlation between the microorganisms for the final pH values of the media, the PCA allowed for the division of the microorganisms (Figure 3B) into 5 groups (I, II, III, IV and V) according to the correlation between them, when the microorganisms closer to each other were more strongly correlated as shown previously.

As can be seen in the dendrogram (Figure 4), the same groups could be formed with the cluster analysis. The name of each microorganism, corresponding to each number of strain is shown in Table 2.

Differently to that observed for the growth rates, various microorganisms of the same genus and/or species presented poor correlation. This difference could be due to the fact mentioned previously, that the formation of products by some of the microorganisms was not associated with cell growth (BORZANI; LIMA; AQUARONE, 1975;

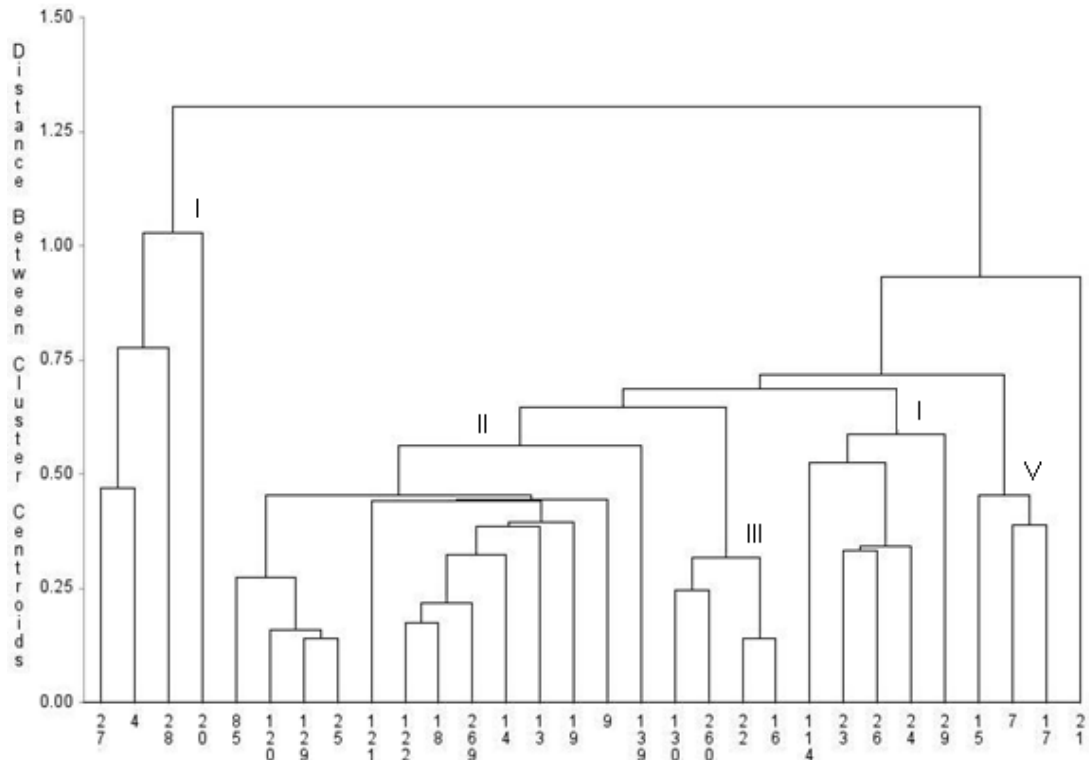


Figure 4 - Dendrogram of the clusters of microorganisms according to the final pH value of the media after 24 hours of incubation with the different supplements added.

CASABLANCAS; SANTÍN, 1998). According to Borzani, Lima and Aquarone (1975), there are cases showing microbial growth during the first 24 hours, with rapid assimilation of the carbon source, followed by a period showing little growth but a high production of metabolites.

Rossi *et al.* (2005) in their studies with fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria, noted that there was no correlation among species, the origin and the ability to ferment inulin. Moreover, they observed that the length of the carbohydrate chain influences the physiological responses. Through principal component analysis, it was observed that there was no strong correlation between enterobacteria species in the fermentation of carbohydrates tested.

CONCLUSION

The use of only the pH value to judge fermentation is not recommended, and the quantification of the substrates added and/or formation of products after a period of incubation is also important in order to observe substrate consumption and/or metabolite production.

Nevertheless the principal component analysis was useful to separate the microorganisms according to their similarities in reducing the pH value of each different substrate. Thus the efficiency of this tool in grouping correlated microorganisms for the two variables tested (pH value and growth rate) was observed.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Brazilian agencies CNPq, CAPES and FAPERGS.

REFERENCES

- AL-SHERAJI, S.H.; ISMAIL, A.; MANAP, M.Y.; MUSTAFA, S.; YUSOF, R.M.; HASSAN, F.A. Prebiotics as functional foods: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1542–1553, 2013.
- BORZANI, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Engenharia Bioquímica**, v.3. Edgar Blucher, São Paulo, Brasil, 1975.
- CASABLANCAS, F.G.; SANTÍN, J.L. Cinética Microbiana. *In*: Casablanca FG, Santín JL (eds). **Ingeniería Bioquímica**, Síntesis, p. 79-101, 1998.
- CASTRO, A.; CÉSPEDES, G.; CARBALLO, S.; BERGENSTAHL, B.; TORNERG, E. Dietary fiber, fructooligosaccharides, and physicochemical properties of homogenized aqueous suspensions of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 392-400, 2013.
- DREVON, T.; BORNET, F. Les FOS: Actilight. *In*: MULTON, J.L. (eds). **Le sucre, les sucres, les edulcorants et les glucides de charges dans les IAA**, Tec & Doc, p. 313-338, 1992.
- GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 237-243, 1995.
- HAIR, J.F.; BLACK, W.C.; BABIN, B.J.; ANDERSON, R.E.; TATHAM, R.L. **Análise multivariada de dados**. 6.ed. Porto Alegre, Bookman, 2009.
- HARA, H.; LI, S.T.; SASAKI, M.; MARUYAMA, T.; TERADA, A.; OGATA, Y.; FUJITA, K.; ISHIGAMI, H.; HARA, K.; FUJIMORI, K.; MITSUOKA, T. Effective Dose of Lactosucrose on Fecal Flora and Fecal Metabolites of Humans. **Bifidobacteria Microflora**, v. 13, n. 2, p. 51-63, 1994.
- HARTEMINK, R.; VAN LAERE, K.M.J.; ROMBOUTS, F.M. Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, n. 3, p. 367-374, 1997.

- HENDRY, G.A.F.; WALLACE, R.K. The origin, distribution and evolutionary significance of fructans. *In*: SUZUKI, M.; CHATTERTON, J.N. (eds.). **Science and Technology of fructan**, CRC Press, p. 119-139, 1993.
- JOLLIFFE, I.T. **Principal Component Analysis**, Springer, 2002.
- KUMAR, V.P.; PRASHANTH, K.V.H.; VENKATESH, Y.P. Structural analyses and immunomodulatory properties of fructo-oligosaccharides from onion (*Allium cepa*). **Carbohydrate Polymers**, v. 117, n. 6, p. 115-122, 2015.
- LAVINE, B.K. Clustering and classification of analytical data. *In*: MEYERS, R.A. (Ed.). **Encyclopedia of analytical chemistry**, John Wiley & Sons Ltd, p. 9689-9710, 2000.
- LINKE, C.M.; WOODIGA, S.A.; MEYERS, D.J.; BUCKWALTER, C.M.; SALHI, H.E.; KING, S.J. The ABC transporter encoded at the pneumococcal fructooligosaccharide utilization locus determines the ability to utilize long- and short-chain fructooligosaccharides. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 5, p. 1031-1041, 2013.
- LUCHESA, C.J. **Estudo da adequação dos índices da análise econômico-financeira às empresas florestais, utilizando métodos estatísticos multivariados**. 2004. 163p. Tese (Doutorado em Economia e Política Florestal) - Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 2004.
- MAO, B.; LI, D.; ZHAO, J.; LIU, X.; GU, Z.; CHEN, Y. Q.; ZHANG, H.; CHEN, W. *In vitro* fermentation of fructooligosaccharides with human gut bacteria. **Food & Function**, v. 6, p. 947-954, 2015.
- MEULEN, R.V.D.; AVONTS, L.; VUYST, L.D. Short Fractions of Oligofructose Are Preferentially Metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-173 010. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 1923-1930, 2004.
- MEYER, D., BAYARRI, S.; TÁRREGA, A.; COSTELL, E. Inulin as texture modifier in dairy products. **Food Hydrocolloid**, v. 25, n. 8, p. 1881-1890, 2011.
- MITSUOKA, T. Bifidobacteria and their role in human health. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 6, n.4, p. 263-267, 1990.
- MOLIS, C.; FLOURIÉ, B.; OUARNE, F.; GAILING, M.F.; LARTIGUE, S.; GUIBERT, A.; *et al.* Digestion, excretion, and energy value of fructooligosaccharides in healthy humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 64, n. 3, p. 324-328, 1996.
- NETO, J.M.M.; MOITA, G.C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**. v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.
- POLLOCK, C.J.; CAIRNS, A.J.; SIMS, I.M.; HOUSLEY, T.L. Fructans as Reserve Carbohydrates in Crop Plants. *In*: ZAMSKI, E.; SHAFFER, A.A. (eds). **Photoassimilate**

- Distribution in Plants and Crops: Source – Sink Relationships**, Marcel Dekker, p. 97-113, 1996.
- ROSSI, M.; CORRADINI, C.; AMARETTI, A.; NICOLINI, M.; POMPEI, A.; ZANONI, S.; *et al.* Fermentation of Fructooligosaccharides and Inulin by Bifidobacteria: a Comparative Study of Pure and Fecal Cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 10, p. 6150-6158, 2005.
- SCHNEEMAN, B.O. Fiber, Inulin and Oligofructose: Similarities and Differences. **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 7, p. 1424S-1427S, 1999.
- SHARMA, S. **Applied multivariate techniques**, Wiley & Sons, 1996.
- SMITH, C.J. Carbohydrate chemistry. *In*: LEA, P.J.; LEE, G.R.C. (eds). **Plant biochemistry and molecular biology**, Wiley & Sons, p. 74-111, 1993.
- STEWART, M.L.; TIMM, D.A.; SLAVIN, J.L. Fructooligosaccharides exhibit more rapid fermentation than long-chain inulin in an in vitro fermentation system. **Nutrition Research**, v. 28, n. 5, p. 329-334, 2008.
- TÁRREGA, A.; ROCAFULL, A.; COSTELL, E. Effect of blends of short and long-chain inulin on the rheological and sensory properties of prebiotic low-fat custards. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 3, p. 556-562, 2010.
- VAN LAERE, K.M.J.; HARTEMINK, R.; BOSVELD, M.; SCHOLS, H.A.; VORAGEN, A.G.J. Fermentation of plant cell wall derived polysaccharides and their corresponding oligosaccharides by intestinal bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 48, p. 1644-1652, 2000.
- VILLEGAS, B.; COSTELL, E. Flow behaviour of inulin–milk beverages. Influence of inulin average chain length and of milk fat content. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 7, p. 776-781, 2007.
- WANG, X.; GIBSON, G.R. Effects of the in vitro fermentation os oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, n. 4, p. 373-380, 1993.