



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**ESTABILIDADE E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE ANTOCIANINAS DO  
RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DA UVA ISABEL CULTIVADA NO VALE DO  
SÃO FRANCISCO**

RAFAELLA DA SILVA BASTOS

RECIFE

2015

RAFAELLA DA SILVA BASTOS

**ESTABILIDADE E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE ANTOCIANINAS DO  
RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DA UVA ISABEL CULTIVADA NO VALE DO  
SÃO FRANCISCO**

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

ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Lúcia Arroxelas Galvão de Lima

CO-ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Enayde de Almeida Mélo

RECIFE

2015

Ficha catalográfica

B327e Bastos, Rafaella da Silva  
Estabilidade e potencial antioxidante de antocianinas do resíduo agroindustrial da uva Isabel cultivada no Vale do São Francisco / Rafaella da Silva Bastos. – Recife, 2015.  
107 f.: il.

Orientadora: Vera Lúcia Arroxelas Galvão de Lima.  
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Ciências Domésticas, Recife, 2015.  
Referências.

1. *Vitis labrusca*. 2. Atividade antioxidante  
3. Estabilidade I. Lima, Vera Lúcia Arroxelas Galvão de, orientadora II. Título

CDD 664

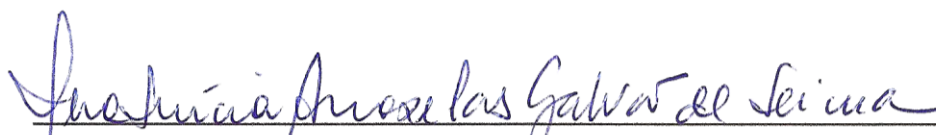
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

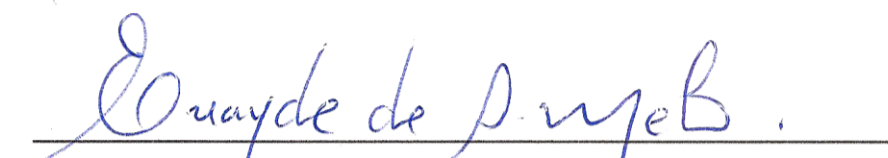
ESTABILIDADE E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE ANTOCIANINAS DO  
RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DA UVA ISABEL CULTIVADA NO VALE DO  
SÃO FRANCISCO

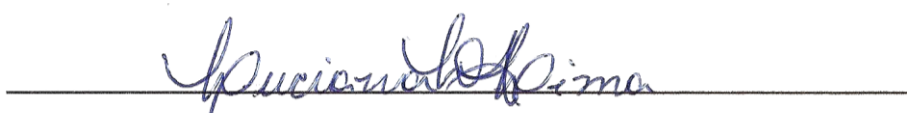
Por Rafaella da Silva Bastos

Esta dissertação foi julgada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em 27/02/2015 pelo programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos em sua forma final.

Banca Examinadora:

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Lúcia Arroxelas Galvão de Lima – DCD/UFRPE  
Orientadora/ Presidente

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Enayde de Almeida Melo – DCD/UFRPE  
Membro interno

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Leite de Andrade Lima – DTR/UFRPE  
Membro externo

## *Dedico,*

*A minha avó, Dadai, pelos momentos de sua vida que me dedicastes com tão puro amor, sobretudo, ao longo de minha jornada acadêmica, a qual prosseguiu com a sua ausência física, mas com a sua presença viva em meu coração. "Àquela nossa amizade", saudades eternas...*

*(In memoriam)*

*Aos meus pais, Jorge e Maria Gírlene, e ao meu irmão, Rodolfo, por incentivarem-me a lutar pelos meus sonhos e não medirem esforços para me ajudar a concretizá-los.*

*Ao meu amor, Henrique, pelo apoio ao dividir comigo, com tanta paciência e compreensão, todos os momentos de razões e emoções envolvidos na realização deste sonho.*

## *Agradecimentos*

*A Deus, por me abençoar com tranquilidade e sabedoria para lidar com as provações da vida e, sobretudo, por me conceder mais esta graça.*

*A Prof<sup>a</sup>. Vera Lúcia Arroxelas Galvão de Lima, por aceitar compartilhar comigo esta experiência, agradeço pelos valiosos ensinamentos, confiança e amizade construída ao longo do desenvolvimento deste trabalho.*

*A Prof<sup>a</sup>. Enayde de Almeida Mélo, pela grande acolhida, contribuição, apoio e paciência nas horas difíceis, imprescindíveis para tornar real este projeto, como também pelo aceite do convite para compor a banca.*

*A Prof<sup>a</sup>. Luciana Leite de Andrade Lima, que gentilmente aceitou o convite para participar da banca examinadora deste trabalho.*

*A UFRPE, pela oportunidade de realizar o mestrado, principalmente ao Departamento de Ciências Domésticas, por fornecer a estrutura necessária para a realização dos experimentos, bem como aos membros que integram o PGCTA, especialmente, aos professores, a técnica de laboratório Jaqueline e a secretária Ana Engracia.*

*A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida.*

*A Embrapa Uva e Vinho/ Semiárido, em nome do Dr. Giuliano Elías Pereira, por proporcionar o estágio realizado, e mais ainda, pela parceria e admirável atenção e presteza ao auxiliar sempre que precisei, sobretudo, na aquisição do material de estudo e na autorização das análises de HPLC.*

*Ao Dr. Luiz Cláudio Corrêa (Embrapa Semiárido), pelas experiências compartilhadas e cooperação ao executar as análises de HPLC, referente à etapa de identificação e quantificação das antocianinas.*

*A Cooperativa Agrícola Nova Aliança (COANA), de modo especial, a Igor Veras Silani, por ceder o resíduo da uva Isabel utilizado nas análises.*

*Aos meus amigos (as) Samara, Rita, Rosa, Cris, Laís, Alinne, Talita, Patricia, Wallace e demais colegas, pela amizade, companheirismo, momentos de aprendizado, e principalmente, por facilitarem esta intensa caminhada.*

*A Karinne, minha grande parceira, pela cumplicidade, paciência e dedicação incansável ao longo da construção deste trabalho, essenciais para tornar mais leve a sua conclusão.*

*A Michelle, minha companheira de classe, pelo compartilhamento de tantos conhecimentos, e também por acreditar em mim nos momentos os quais eu mais precisei.*

*A Auana, minha irmã de coração, pela inabalável amizade, por crer nos meus ideais, incentivando-me sempre com suas palavras doces de carinho.*

*Aos demais amigos e familiares, por compreenderem a minha ausência, e a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a concretização deste sonho...*

**Muito obrigada!**

*"Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante."*

*— Antoine de Saint-Exupéry*



# RESUMO

---

---

Elevada quantidade de subprodutos vitivinícolas é produzida em decorrência do processamento de uvas no Brasil. Considerando a presença de pigmentos bioativos em sua composição, objetivou-se neste trabalho investigar o potencial antioxidante e a estabilidade das antocianinas do resíduo agroindustrial de suco de uva. O resíduo de uva (*Vitis labrusca*, cv. Isabel) foi cedido por uma indústria produtora de suco de uva integral, situada na região do Vale do São Francisco, Petrolina-PE. O teor de antocianinas totais foi determinado utilizando metodologia de pH diferencial. Para identificação e quantificação das antocianinas individuais, análises cromatográficas foram efetuadas por CLAE-DAD em fase reversa. A atividade antioxidante das antocianinas foi avaliada quanto à capacidade de sequestro dos radicais DPPH<sup>•</sup> (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-acido sulfônico), tendo o ácido gálico como composto de referência. Para avaliar a estabilidade à luz, as antocianinas foram diluídas em uma solução de etanol 95%: HCl 1,5N; 85:15 v/v (pH = 1,0) e distribuídas em tubos de ensaio, expostos à luz e ao abrigo da luz, a 21°C ± 1°C, durante um período de 840 horas (35 dias), monitorados por leituras em espectrofotômetro. O efeito da temperatura sobre a estabilidade das antocianinas foi avaliado utilizando tubos de ensaio contendo antocianinas diluídas em água acidificada com HCl (pH = 1,0) e submetidos a temperaturas de 50°C, 70°C e 90°C, em banho termostatizado. Leituras de absorbância foram realizadas na amostra recém-preparada (0h) e após 1, 3, 5 e 7 horas de aquecimento. Os dados de absorbância foram utilizados para o cálculo da constante de velocidade (k) e do tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) das antocianinas por meio de equações cinéticas de 1ª ordem. O teor médio de antocianinas totais foi de 31,66 mg. 100g<sup>-1</sup> de resíduo (expresso em malvidina-3-glicosídeo). Seis antocianinas majoritárias foram identificadas: cianidina-3-O-glicosídeo; delfinidina-3-O-glicosídeo; malvidina-3-O-glicosídeo; malvidina-3,5-O-glicosídeo; pelargonidina-3-O-glicosídeo; e peonidina-3-O-glicosídeo, em diferentes concentrações. Malvidina-3-O-glicosídeo foi a mais abundante (61,66%) seguida da malvidina-3,5-O-diglicosídeo (14,88%). A fração antociânica demonstrou elevado potencial antioxidante frente ao radical DPPH<sup>•</sup> (EC<sub>50</sub>: 0,26 g. g DPPH<sup>•-1</sup>; T<sub>EC50</sub>: 1,37 minutos; EA: 2,79). Aos 5 minutos de reação, nas concentrações de 5 a 40 µg. mL<sup>-1</sup>, apresentou variações no percentual de sequestro entre 48 e 94%, respectivamente, constatando uma alta correlação entre o teor de antocianinas e a capacidade antioxidante (R = 0,93). Frente ao radical ABTS<sup>•+</sup> as antocianinas exibiram significativa ação na captura do radical com valor de 199,35 µM Trolox. g<sup>-1</sup>. Na ausência de luz, o tempo de meia vida dos pigmentos antociânicos foi de 3.320h (138 dias), e na presença de luz foi de 505h (21 dias), apresentando constantes de velocidade de 2,09 x 10<sup>-4</sup> h<sup>-1</sup> e 1,37 x 10<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente, demonstrando que a luminosidade contribuiu para a instabilidade das antocianinas. No estudo de estabilidade ao calor, as constantes de velocidade foram: 1,84 x 10<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> (50°C); 7,82 x 10<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> (70°C); e 1,99 x 10<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (90°C). O tempo de meia-vida ocorreu após 3,5h a temperatura de 90°C, e ocorreria após 8,9h e 37,7h, a 70°C e 50°C, respectivamente, constatando a maior instabilidade das antocianinas à altas temperaturas. As antocianinas do resíduo de suco de uva cv. Isabel são uma fonte promissora de corante natural que possui ação antioxidante, com potencial aplicação em produtos alimentícios que tenham pH ácido, sejam acondicionados em embalagens opacas, e não sejam submetidos à tratamentos térmicos severos durante o seu processamento.

**Palavras-chave:** *Vitis labrusca*; Atividade Antioxidante; Estabilidade.

Large amounts of wine by-products are produced as a result of processing grapes in Brazil. Considering the presence of bioactive pigments in this material, the aim of this work was to investigate the antioxidant potential and stability of anthocyanins from the grape juice pomace. The grape residue (*Vitis labrusca*, cv. Isabella) was ceded by an industry producing of pure grape juice, located in the region São Francisco Valley, in the city of Petrolina-PE. The anthocyanin content was determined using pH-differential method. The isolated anthocyanin were identified and quantified by chromatography analysis using a RP-HPLC-DAD system. The antioxidant activity of the purified anthocyanins were evaluated for their ability to scavenge free radicals DPPH<sup>•</sup> (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and ABTS<sup>•+</sup> [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6sulfonic acid)], using gallic acid as standard. Purified anthocyanins were diluted in ethanol solution 95%: HCl 1.5N; 85:15 v/v (pH = 1.0) to evaluate the light stability, and distributed into test tubes, exposed and not exposed to light for a period of 840 hours (35 days) at 21°C ± 1°C, monitored by spectrophotometer readings. The effect of temperature on the stability of anthocyanins was evaluated using test tubes containing purified anthocyanins diluted into water, acidified with HCl (pH = 1.0), and subjected to temperatures of 50°C, 70°C and 90°C in thermostatic bath. Absorbance readings were made in the control sample (0h), and after 1, 3, 5 and 7 hours of heating. The absorbance data were used to calculate the rate constant (k) and half-life (t<sub>1/2</sub>) of anthocyanins through first-order kinetics equations. The average content of anthocyanins was 31.66 ± 0.63 mg. 100g<sup>-1</sup> residue (expressed as malvidin-3-glucoside). A total of six majority different anthocyanins were identified: cyanidin-3-O-glucoside, delphinidin-3-O-glucoside, malvidin-3-O-glucoside, malvidin-3,5-O-diglucoside, pelargonidin-3-O-glucoside and peonidin-3-O-glucoside, with different concentrations. Malvidin 3-glucoside was the most abundant (61.66%) of the total observed, while malvidin-3,5-O-diglucoside (14.88%) was the second. The anthocyanin fraction showed high antioxidant potential against the radical DPPH<sup>•</sup> (EC<sub>50</sub>: 0.26 g. g DPPH<sup>•-1</sup>; T<sub>EC50</sub>: 1.37 minutes; AE: 2.79). After 5 minutes of reaction, at concentrations of 5-40 µg. mL<sup>-1</sup>, showed variations in the percentage scavenging between 48 and 94%, respectively, though there is a high correlation between anthocyanin content and antioxidant capacity (R = 0.93). Against the radical ABTS<sup>•+</sup> anthocyanins exhibited significant action in capturing the radical with value of 199.35 µM Trolox. g<sup>-1</sup>. The half-life (t<sub>1/2</sub>) of the anthocyanin pigments, in the absence of light, was 3.320h (138 days) and in the presence of light was 505h (21 days), with the follows rate constants (k): 2.09 x 10<sup>-4</sup> h<sup>-1</sup> e 1.37 x 10<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>, respectively, showing that presence of light contributed significantly to the instability of anthocyanins. In the study of heat stability, the rate constants (k) were: 1.84 x 10<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> (50°C); 7.82 x 10<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> (70°C); and 1.99 x 10<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (90°C). The half-life of the samples occurred after 3.5h at 90°C and would occur after 8.9h and 37.7h for the samples at 70°C and 50°C, respectively, indicating the higher instability of anthocyanins to high temperatures. Anthocyanins from cv. Isabella grape juice residue are a promising source of natural dye which has antioxidant action with potential application in food products with an acidic pH, packaged in opaque packaging, and not subjected to severe heat treatment during processing.

**Keywords:** *Vitis Labrusca*; Antioxidant Activity; Stability.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	17
<b>2.1 GERAL</b> .....	18
<b>2.2 ESPECÍFICOS</b> .....	18
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
<b>3.1 VITICULTURA BRASILEIRA</b> .....	20
3.1.1 Vale do São Francisco.....	21
<b>3.2 VIDEIRA (<i>Vitis ssp.</i>)</b> .....	23
3.2.1 Suco de uva.....	24
<b>3.3 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E COMPOSTOS BIOATIVOS</b> ...	27
<b>3.4 ANTOCIANINAS</b> .....	29
3.4.1 Ação antioxidante .....	31
3.4.2 Estabilidade e aplicação como corante natural.....	33
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	36
<b>4. RESULTADOS</b> .....	50
 <b>CAPÍTULO I</b>	
 <b>ARTIGO I: IDENTIFICAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE ANTOCIANINAS DO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DE SUCO DE UVA cv. ISABEL</b> .....	
<b>RESUMO</b> .....	52
<b>ABSTRACT</b> .....	53
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	54
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	56
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	63
<b>CONCLUSÃO</b> .....	73
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	74

**CAPÍTULO II**

<b>ARTIGO II: ESTABILIDADE DE ANTOCIANINAS DO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DE SUCO DE UVA cv. ISABEL PRODUZIDA NO VALE DO SÃO FRANCISCO.....</b>	<b>86</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>87</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>88</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>91</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>94</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>101</b>
<b>5. CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>107</b>

# 1. INTRODUÇÃO

---

O Brasil possui ampla variedade de espécies frutíferas nativas e/ou exóticas com vasto potencial agroindustrial. Dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação relatam que o país encontra-se em décimo primeiro lugar na produção mundial de uva (FAO, 2013). Esta situação contribui para que a viticultura destaque-se no setor de fruticultura, assim como no agronegócio brasileiro, promovendo a geração de emprego, renda e desenvolvimento rural (ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2013). Neste cenário, a região do Vale do São Francisco constitui um exemplo do potencial de crescimento e desenvolvimento da viticultura brasileira, tendo em vista que representa uma parcela significativa da produção Nacional de uva, tanto na obtenção de frutos *in natura* como na fabricação de vinhos, sucos e derivados (BRASIL, 2007; IBGE, 2010).

Segundo Francis (1989), as antocianinas, pigmentos solúveis em água, compõem o grupo dos compostos fenólicos, especificamente dos flavonoides, e estão presentes em uvas e derivados, como também em diversas fontes vegetais. Nos últimos anos, a capacidade antioxidante e corante das antocianinas tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores (LIMA; MÉLO; LIMA, 2005; GÓMEZ-PLAZA; MIÑANO; LÓPEZ-ROCA, 2006; GARZÓN; RIEDL; SCHWARTZ, 2009; PACHECO-PALENCIA; DUNCAN; TALCOTT, 2009; CEREZO *et al.*, 2010; HOGAN *et al.*, 2010; PATRAS *et al.*, 2010; CLEMENTE; GALLI, 2011; LIMA *et al.*, 2011; YUAN *et al.*, 2011; MAYAVEL *et al.*, 2012; CUI *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2013; PITIJA *et al.*, 2013). Na indústria alimentícia, os antioxidantes são aplicados como aditivos alimentares para evitar a oxidação lipídica ou mesmo, como ingredientes de alimentos funcionais em virtude de sua atividade biológica relacionada à prevenção de certas patologias (POKORNY; YANISHLIEVA; GORDON, 2001). Por outro lado, os corantes também possuem aplicação como aditivos em alimentos, a fim de contribuir para as características sensoriais dos mesmos (BRASIL, 1997).

Considerando as possíveis reações adversas à saúde apresentadas por esses compostos sintéticos, há um interesse crescente no uso de antioxidantes e corantes naturais extraídos de fontes alternativas (AYALA-ZAVALA *et al.*, 2011; BOTTERWERCK *et al.*, 2000). Assim, a obtenção de antocianinas a partir do resíduo agroindustrial de uva apresenta impactos ambientais e econômicos positivos, considerando a reutilização dos resíduos, que, na maioria das vezes,

são descartados, sem tratamento, no meio ambiente. Além de que, este material geralmente não possui valor para a cadeia produtiva, e o seu descarte implica em gastos para o produtor (MELO *et al.*, 2011). A sociedade presencia o atual esgotamento de recursos e a acumulação de resíduos, ambos contribuindo para a elevação de custos com matéria-prima (PFALTZGRAFF *et al.*, 2013). Ao mesmo tempo em que a Política Nacional de Resíduos Sólidos prevê metas de redução, reutilização, reciclagem, entre outras, com vistas a reduzir a quantidade de resíduos e rejeitos encaminhados para disposição final ambientalmente adequada (BRASIL, 2010a).

Em vista disso, a utilização de compostos bioativos obtidos a partir do material residual de frutas possibilita a fabricação de produtos de baixo custo e ecologicamente corretos (BABBAR *et al.*, 2011; LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROEM, 2003; ROSA *et al.*, 2011). Contudo, estudos como este são necessários para estimular a inserção desses produtos no mercado. Alguns autores têm investigado extratos brutos antociânicos de subprodutos de uvas tintas, sobretudo, de vinhos (FONTANA; ANTONIOLLI; BOTTINI, 2013; MAKRIS; KEFALAS, 2013; GARCÍA-LOMILLO *et al.*, 2014; KY *et al.*, 2014). Entretanto, ainda são escassas informações a respeito da ação antioxidante e estabilidade de antocianinas extraídas do resíduo de suco de uvas. Assim, a constatação destas evidências associada à elevada geração de resíduos sólidos pela agroindústria motivou a realização deste estudo, com o propósito de investigar o potencial antioxidante e a estabilidade das antocianinas purificadas do resíduo agroindustrial de suco de uva cv. Isabel.



## **2. OBJETIVOS**

---

---

## 2.1 GERAL

Investigar o potencial antioxidante e a estabilidade das antocianinas purificadas do resíduo agroindustrial de suco de uva cv. Isabel.

## 2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar o teor de antocianinas totais, identificar e quantificar as antocianinas majoritárias presentes neste resíduo;
- Avaliar o potencial antioxidante das antocianinas frente aos radicais livres DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>;
- Verificar a estabilidade das antocianinas frente à luz e ao calor.

# **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

---

### 3.1 VITICULTURA BRASILEIRA

Dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, que se referem ao ano de 2011, mostram que o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, com uma produção de aproximadamente 41 milhões de toneladas, ficando atrás somente da China e Índia (FAO, 2013). Desse modo, o setor de fruticultura é considerado um dos mais importantes segmentos do agronegócio brasileiro, sendo também um dos principais geradores de emprego, renda e desenvolvimento rural. Estima-se que a atividade seja responsável por criar 2,5 milhões de oportunidades no mercado de trabalho Nacional (ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2013).

As condições favoráveis de clima, solo, extensão territorial e posição geográfica do Brasil admitem a produção de diversas frutas tropicais, subtropicais e temperadas, fato que beneficia o desenvolvimento do setor, e, aliado à pesquisa, gera tecnologias e variedades adaptadas para o cultivo em condições diversas, possibilitando que a produção ocorra em todos os estados brasileiros, durante todos os meses do ano em função da fruta e safra (BRASIL, 2007, 2010b). As frutíferas brasileiras predominantes, em relação aos valores de produção, são banana, laranja e uva (IBGE, 2013).

A cultura da videira apresenta importância agrícola e econômica no mundo inteiro, inclusive no Brasil, que é o décimo primeiro produtor mundial de uva (FAO, 2013). Tradicionalmente, o Rio Grande do Sul é o principal estado produtor de uva do país, contribuindo anualmente com mais da metade da produção Nacional, conforme os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Segundo este mesmo órgão, Petrolina-PE foi considerado o município brasileiro que mais produziu uva em 2010 (141.480 toneladas), sendo responsável por 72,5% da produção do estado de Pernambuco e 10,5% da produção Nacional a frente da tradicional Bento Gonçalves-RS (IBGE, 2010). Além disso, o maior valor de produção gerado por frutíferas no ano de 2013 também foi atribuído à Petrolina, arrecadando ao total 918 milhões de reais, correspondendo a 3,9% da produção Nacional (IBGE, 2013). Nos últimos anos, a produção de uva tem sido relativamente estável no Brasil. Em 2008, a produção total foi de 1.399.262 toneladas, apresentando discreto aumento no ano de 2013 ao atingir 1.439.535 toneladas (Tabela 1).

**Tabela 1 - Produção de uva no Brasil, em toneladas.**

Ano	2008	2009	2010	2011	2012	2013
<b>Estado</b>						
Pernambuco	162.977	158.515	168.225	208.660	224.758	228.727
Bahia	101.787	90.508	78.283	65.435	62.292	52.778
Minas Gerais	13.711	11.773	10.590	9.804	10.107	12.725
São Paulo	184.930	177.934	177.538	177.227	176.902	166.602
Paraná	101.500	102.080	101.900	105.000	70.500	88.402
Santa Catarina	58.330	67.546	66.124	67.767	70.909	69.503
Rio Grande do Sul	776.027	737.363	692.692	829.589	840.251	807.693
<b>BRASIL</b>	<b>1.399.262</b>	<b>1.345.719</b>	<b>1.295.442</b>	<b>1.463.481</b>	<b>1.445.809</b>	<b>1 439.535</b>

Fonte: Adaptado de Mello (2013) e IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Produção Agrícola Municipal (2013).

### 3.1.1 Vale do São Francisco

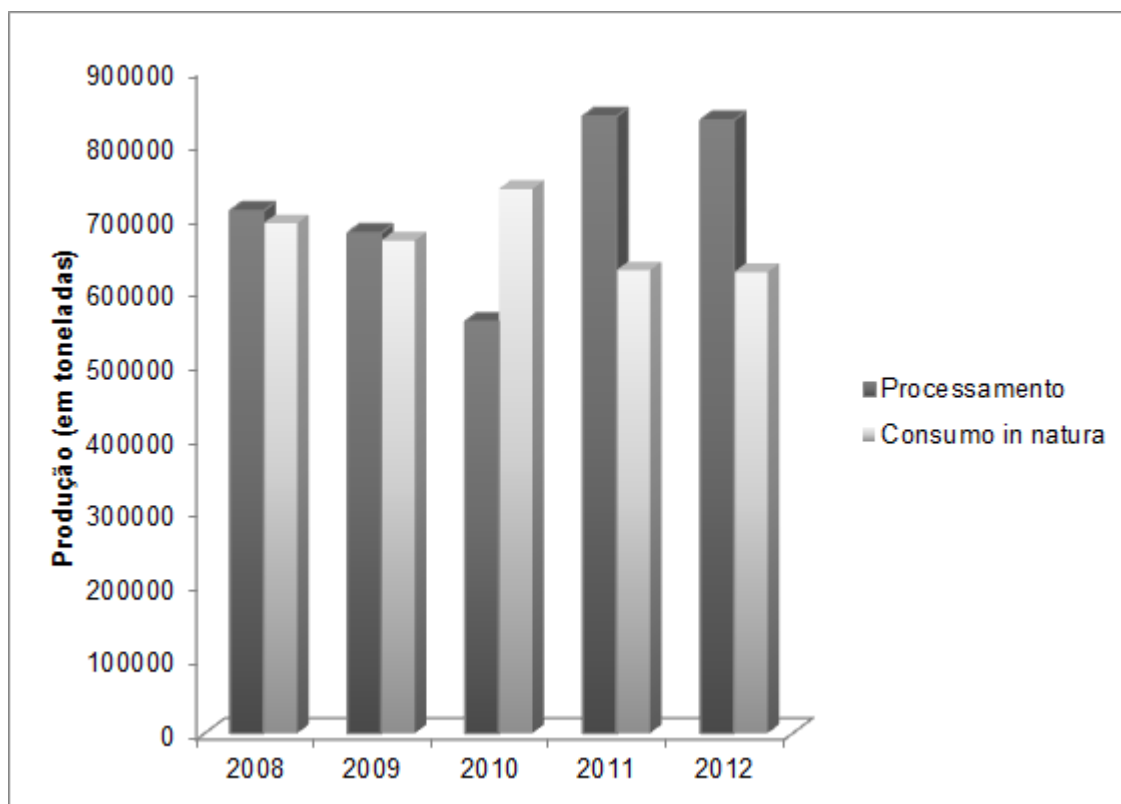
O polo de frutas situado entre as cidades de Petrolina, em Pernambuco, e Juazeiro, na Bahia – ou simplesmente região do Vale do São Francisco – é um exemplo do potencial de crescimento e desenvolvimento da fruticultura brasileira (BRASIL, 2007). Caracteriza-se por ser uma região tropical de clima semiárido com particularidades distintas das regiões de cultivo de uva tradicionais, incluindo mais de 3.000h de sol por ano, baixo índice pluviométrico, temperatura média elevada e umidade relativa baixa. Sendo assim, é considerada pioneira na produção de uva e vinho sob condições tropicais no Brasil (PROTAS; CAMARGO, 2011). Parte considerável das frutíferas em Pernambuco é cultivada nos perímetros irrigados, com o emprego de alta tecnologia e mão de obra especializada, fato que contribui para a alta qualidade dos frutos, que têm como destino principal o mercado externo (IBGE, 2010).

A produção de uva de mesa, em especial a cultura de uva sem semente destinada à exportação, e a elaboração vinho são os principais focos dessa

região. Entretanto, Protas e Camargo (2011) ressaltam diversos projetos em andamento, prevendo-se crescimento significativo da produção de suco de uva, especialmente relacionado à fabricação em sistema de integração com as pequenas propriedades e agricultores assentados da reforma agrária existentes na região, oferecendo boa alternativa de produção graças à sua rusticidade e produtividade elevada.

Mello (2013) afirma que a vitivinicultura é essencial para a sustentabilidade da pequena propriedade no Brasil. A atividade tem se destacado na geração de emprego em empreendimentos produtores de uvas de mesa e uvas para processamento. Em 2012, a produção de uva destinada ao processamento (vinho, suco e derivados) foi de 830.915 toneladas, o que representa 57,07% da produção Nacional. O restante da produção (42,93%) foi direcionado ao consumo *in natura* (Figura 1). Apenas nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina a produção de suco de uva representou, aproximadamente, 40% de um total de 600,49 milhões de litros produzidos para a fabricação de vinho, suco e derivados.

**Figura 1 - Produção de uvas para processamento e para consumo *in natura*, no Brasil, em toneladas.**



Fonte: Adaptado de Mello (2013).

### 3.2 VIDEIRA (*Vitis* ssp.)

A videira pertence à família *Vitaceae* e ao gênero *Vitis*, que compreende várias espécies, entre as quais se destacam a *Vitis vinifera*, de origem europeia e que produz uvas finas, e a *Vitis labrusca*, de origem americana, produtora de uvas rústicas (GIOVANNINI, 2005). Registros históricos indicam que a primeira introdução da videira no Brasil foi realizada pelos colonizadores portugueses em 1532, por meio de Martin Afonso de Souza, na antiga capitania de São Vicente, hoje estado de São Paulo. A viticultura então se expandiu para outras regiões do país com variedades de *Vitis vinifera* procedentes de Portugal e Espanha. Nas primeiras décadas do século XIX, com a importação das uvas americanas originárias da América do Norte, a cultivar 'Isabel' (Figura 2) passou a ser plantada nas diversas regiões do país, tornando-se a base para o desenvolvimento da vitivinicultura comercial naquela época (PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2002). Atualmente, as videiras americanas são amplamente cultivadas no Brasil. Os frutos são considerados bagas globosas, de epicarpo fino e liso, com polpa suculenta de sabor doce-acidulado e são consumidos principalmente *in natura* (frescos e em sucos) (LORENZI *et al.*, 2006). Incluem variedades de alta produtividade e resistentes às doenças fúngicas, que se adaptam bem às condições ambientais brasileiras e constituem a base da produção de vinhos de mesa e de suco de uva no país, representando mais de 85% do volume de uvas industrializadas no Brasil (CAMARGO; MAIA; NACHTIGAL, 2005).

**Figura 2 - Cultivar 'Isabel' (*Vitis labrusca*), amplamente cultivada no Brasil.**



Fonte: Embrapa Uva e Vinho.

Considerada um híbrido natural das espécies *V. labrusca* e *V. vinifera*, a cultivar 'Isabel' é uma videira tinta, fértil e rústica, própria para colheitas abundantes e poucas intervenções de manejo. A uva tem o sabor característico das labruscas e adapta-se para a produção de uva de mesa e como matéria-prima para a fabricação de vinagre, doce e geleia. É a variedade mais plantada no Rio Grande do Sul e Santa Catarina (CAMARGO, 2008), representando cerca de 50% do volume de uvas processadas no Brasil (CAMARGO, 2004). Surge como opção, inclusive, para a viticultura tropical brasileira, sendo também utilizada na elaboração de sucos de alta qualidade (IBRAVIN, 2010).

### 3.2.1 Suco de uva

A legislação brasileira define suco de uva como a bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível da uva, através de processo tecnológico adequado. Apresenta cor, aroma e sabor característicos. Quanto à cor, é classificado como vinho, rosado e translúcido (branco). O sabor e aroma devem ser próprios da uva que deu origem ao suco (BRASIL, 2000). Em relação ao processamento e constituição é designado como suco de uva integral, concentrado, desidratado e reprocessado (Tabela 2) (BRASIL, 2004).

**Tabela 2 - Tipos de sucos de uva normatizados pela legislação brasileira.**

Tipos de suco de uva	Designação
Integral	É apresentado na sua concentração e composição natural, límpido ou turvo, sem adição de açúcares.
Concentrado	É parcialmente desidratado, por meio de processo tecnológico adequado, apresentando concentração mínima equivalente a 65 °Brix em sólidos naturais da fruta.
Desidratado	É o produto sob a forma sólida, obtido pela desidratação do suco de uva, cujo teor de umidade não exceda a 3%.
Reprocessado ou reconstituído	É obtido pela diluição do concentrado e/ou desidratado até a sua concentração natural.

Fonte: Adaptado de Brasil (2004).

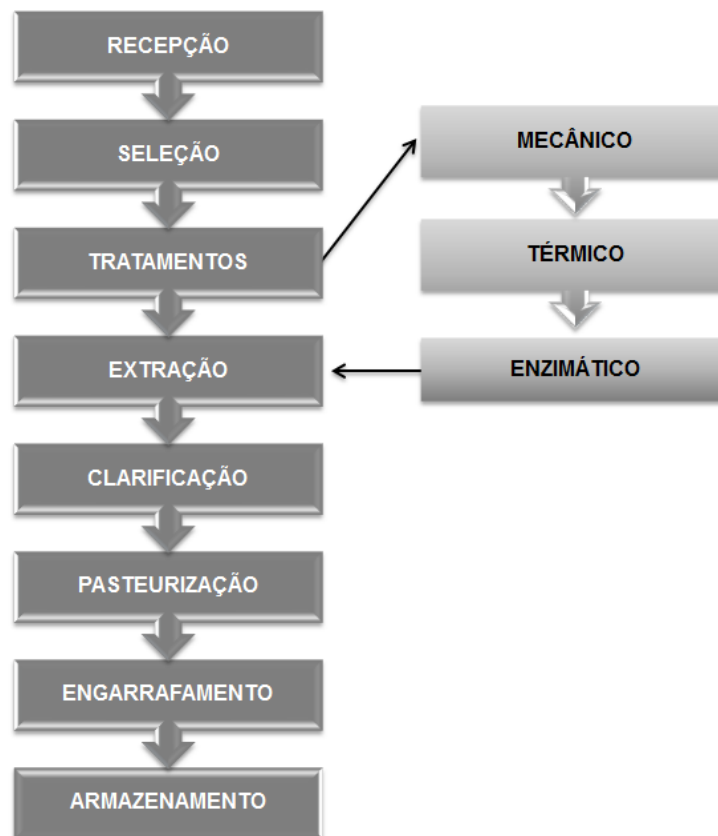


De acordo com Rizzon e Meneguzzo (2007), as etapas de produção de suco de uva integral ocorrem, de forma geral, conforme a seguir:

- 1) **Recepção:** recebimento da uva na área de entrada da agroindústria;
- 2) **Seleção:** controle da cultivar para garantia da procedência conforme a característica e estado sanitário, pesagem da uva e determinação do teor de açúcar do mosto para o cálculo do rendimento;
- 3) **Tratamento mecânico:** separação de ráquis e esmagamento da uva para extração da cor, que é obtida por meio do aumento da superfície de contato entre o mosto e a parte sólida, facilitando a dissolução das antocianinas;
- 4) **Tratamento térmico:** aquecimento da uva esmagada (realizado de forma indireta) para extração das antocianinas presentes na película. A temperatura de aquecimento deve alcançar no mínimo 65°C para proporcionar uma adequada extração da cor, contudo, não pode ultrapassar 90°C para não atribuir sabor de cozido ao suco;
- 5) **Tratamento enzimático:** adição de enzimas (pectinolíticas ou pectinases) para hidrólise das pectinas da uva e auxílio das etapas de extração e clarificação. Emprega-se a temperatura ótima de atuação da enzima industrial, que varia de 50°C a 60°C;
- 6) **Extração:** separação da parte sólida da uva (película e semente) para evitar a dilaceração excessiva da película, reduzir o aparecimento de sabores herbáceos e facilitar a operação de prensagem a fim de otimizar a relação rendimento/qualidade. Nesta etapa do processo, o suco apresenta-se turvo em razão da presença de partes da película e sais de potássio em suspensão;
- 7) **Clarificação:** obtida através de despectinização, filtração ou estabilização tartárica;
- 8) **Pasteurização:** conservação por tratamento térmico para destruir os microrganismos patogênicos e inativar as enzimas;
- 9) **Engarrafamento:** realizado após conformidade dos parâmetros analíticos com os limites estabelecidos pela legislação brasileira;
- 10) **Armazenamento:** conservação em local seco, isento de odores desagradáveis, sem incidência de luz solar direta, com umidade relativa de 70 a 75% e temperatura controlada de 12°C a 15°C.

O processo genérico de elaboração de suco de uva integral encontra-se ilustrado no fluxograma abaixo (Figura 3).

**Figura 3 - Fluxograma genérico do processo de produção de suco de uva integral.**



Fonte: Adaptado de Rizzon e Meneguzzo (2007).

O suco de uva tem sido bastante contemplado por seus atributos positivos (MAIA *et al.*, 2013), pois além de possuir açúcares e sais minerais em sua composição, apresenta ainda teores significativos de polifenóis (PONTES *et al.*, 2010). Os efeitos antioxidantes *in vitro* destes compostos em sucos de uva são similares à ação antioxidante *in vitro* dos vinhos tintos (MALACRIDA; MOTTA, 2005). Desta forma, sua ingestão vem sendo valorizada pelo consumidor brasileiro, sinalizando uma tendência de aumento em seu consumo (MAIA *et al.*, 2013). No Brasil, foram comercializados cerca de 78,03 milhões de litros de suco de uva (92% do tipo integral) em 2013, observando-se um acréscimo de 101,46% em relação à média (38,73 milhões de litros) dos anos anteriores (2008 a 2012) (CONAB, 2013). Em decorrência deste consumo, é gerado um grande volume de resíduos sólidos pela indústria vinícola.

### 3.3 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E COMPOSTOS BIOATIVOS

De acordo com a Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010, que instituiu a Política Nacional de Resíduos Sólidos, o termo resíduo sólido é definido como:

Material, substância, objeto ou bem descartado resultante de atividades humanas em sociedade, a cuja destinação final se procede, se propõe proceder ou se está obrigado a proceder, nos estados sólido ou semissólido, bem como gases contidos em recipientes e líquidos cujas particularidades tornem inviável o seu lançamento na rede pública de esgotos ou em corpos d'água, ou exijam para isso soluções técnica ou economicamente inviáveis em face da melhor tecnologia disponível (BRASIL, 2010a).

No Brasil, os significativos avanços no desempenho do agronegócio implicaram no aumento do consumo de insumos e da geração de resíduos nas atividades agropecuária e agroindustrial (ROSA *et al.*, 2011). Com isso, grande quantidade de resíduos sólidos é produzida anualmente pela indústria de alimentos, a qual dá origem, principalmente, a resíduos constituídos de material orgânico biodegradável (MAKRIS; BOSKOU; ANDRIKOPOULOS, 2007). De modo geral, a indústria processadora de frutas produz uma quantidade elevada de subprodutos, tais como cascas, sementes ou restos de polpa, procedentes das diferentes etapas da cadeia produtiva (AYALA-ZAVALA *et al.*, 2011). Na maioria das vezes, em razão da indisponibilidade de infraestrutura adequada para lidar com tamanho volume de biomassa gerado, esses resíduos não encontram qualquer uso comercial e são descartados, sem nenhum tratamento, ocasionando sérios problemas ambientais. A minoria restante é, geralmente, utilizada na indústria de ração animal ou no campo, como fertilizante orgânico. O descarte desse material no meio ambiente é realizado de tal modo a impactar negativamente a cadeia produtiva (MELO *et al.*, 2011).

Nesse sentido, vários pesquisadores têm dedicado seus esforços para avaliar as diversas propriedades e usos destes materiais a fim de mitigar o impacto ambiental gerado e buscar potenciais aplicações industriais que envolvam benefícios econômicos. Algumas das áreas dessas investigações foram a obtenção de combustíveis (PARAWIRA *et al.*, 2008), produção de biomassa (PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007), biopesticidas (CAYUELA *et al.*, 2008),

aromas e compostos aplicáveis à indústria alimentar (GIOIA *et al.*, 2007; TORRES *et al.*, 2009).

Os subprodutos desperdiçados no processamento de frutas provavelmente contêm substâncias de alto valor comercial, como por exemplo, os compostos bioativos, que possivelmente estão presentes em quantidades semelhantes ou ainda mais altas do que no produto final (AYALA-ZAVALA *et al.*, 2011). Em vista disso Babbar *et al.* (2011) e Rosa *et al.* (2011) ressaltam que uma das alternativas mais eficazes para minimizar os danos ambientais causados pelo descarte desses resíduos, é a sua reutilização pela indústria – seja alimentícia, farmacêutica ou cosmética. Laufenberg, Kunz e Nystroem (2003) sugerem a recuperação das substâncias bioativas<sup>1</sup> que podem estar presentes, e, sua sucessiva transformação como fonte de ingredientes para novos produtos, em matéria-prima para processos secundários, ou mesmo, em outros produtos comerciais. Os impactos negativos, tanto econômicos quanto ambientais, têm sido motivo de estudos, que ao explorarem os subprodutos ricos em compostos bioativos buscam potenciais aplicações industriais que, ao mesmo tempo, apresentem benefícios de um modo geral e minimizem esses impactos (PFALTZGRAFF *et al.* 2013). Na indústria de alimentos, estes compostos podem ser empregados como fontes naturais de ingredientes de alimentos funcionais ou até mesmo de aditivos alimentares, como por exemplo, antioxidantes e corantes (AYALA-ZAVALA *et al.*, 2011).

A indústria de vinho produz quantidade expressiva de subprodutos sólidos, incluindo bagaço (cascas e sementes) e engaço, representando, em média, cerca de 30% das uvas utilizadas para a produção vinícola (MAKRIS; BOSKOU; ANDRIKOPOULOS, 2007). Resíduos de uva são caracterizados por altos teores de polifenóis em decorrência de uma extração incompleta durante o processo de vinificação. Logo, este material constitui uma fonte barata para a extração de compostos fenólicos, tais como os flavonoides<sup>2</sup>, que podem ser reutilizados em favor da sustentabilidade das práticas agrícolas em diferentes segmentos da indústria (FONTANA, ANTONIOLLI E BOTTINI, 2013).

---

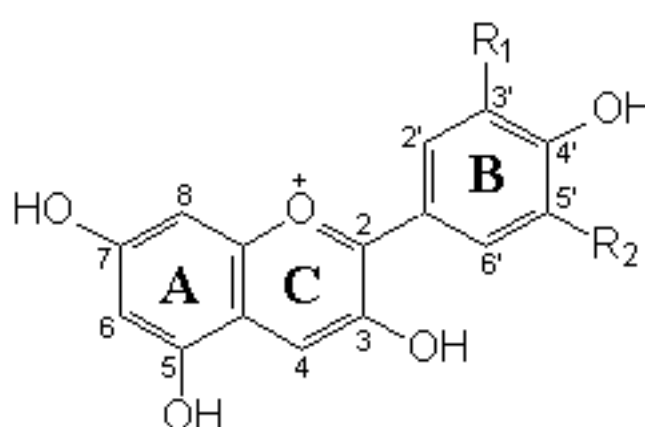
<sup>1</sup> Substâncias bioativas: são nutrientes ou não-nutrientes que possuem ação metabólica ou fisiológica específica (BRASIL, 2002).

<sup>2</sup> Flavonóides: metabólitos secundários de plantas que geralmente estão envolvidos na defesa contra a radiação ultravioleta ou agressão por patógenos (ROSS; KASUM, 2002).

### 3.4 ANTOCIANINAS

As antocianinas (do grego *anthos*, flor e *kianos*, azul), classificadas como pigmentos solúveis em água, são responsáveis pela grande variedade de cores exibidas pelas frutas, hortaliças, flores, folhas e raízes, conferindo as várias nuances entre os tons de laranja, vermelho e azul (FRANCIS, 1989). Essencialmente, integram o grupo dos compostos fenólicos e pertencem ao subgrupo dos flavonóides, que apresentam uma estrutura básica formada por dois anéis aromáticos (A e B) ligados por meio de três carbonos, que geralmente formam um heterociclo oxigenado (C), denominado cátion flavilium (2-fenilbenzopirilium) (BRAVO, 1998). Do ponto de vista químico, Francis (1989) define as antocianinas como glicosídeos, que por hidrólise ácida, liberam agliconas denominadas de antocianidinas e, dentre as encontradas na natureza, apenas seis estão presentes nos alimentos: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina, estas diferem entre si quanto ao número de grupos funcionais, como as hidroxilas (OH) e metoxilas (-OCH<sub>3</sub>) presentes no anel B (Figura 4).

Figura 4 - Estrutura das principais agliconas de ocorrência natural.



Antocianidinas	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Pelargonidina	H	H
*Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

\*Antocianidina mais comum nos alimentos.

Fonte: adaptado de Rodriguez-Saona e Wrolstad (2001).

Antocianidinas livres são raramente encontradas em vegetais. Normalmente, estão ligadas a outras moléculas de açúcares (forma glicosilada), sendo os mais comuns: glicose, ramnose, xilose, galactose, arabinose e frutose, podendo ocorrer na forma de monoglicosídeos, diglicosídeos e triglicosídeos. Na maioria das vezes, os açúcares presentes na molécula de antocianina são acilados a grupos de ácidos orgânicos, como por exemplo, *p*-cumárico, ferúlico, caféico, *p*-hidroxibenzóico, sinápico, malônico, acético, succínico, oxálico e málico, que geralmente se encontram ligados à hidroxila do açúcar na posição 3 e com menor frequência nas posições 4 e 6 (FRANCIS, 1989, 2000). A glicosilação pode ocorrer em várias posições, sendo habitualmente observada na posição 3. No caso de diglicosilação, o segundo açúcar geralmente encontra-se na posição 5, e de outras glicosilações, nas posições 7, 3', 4' e 5'. Vale salientar que a antocianina natural jamais ocorre com as hidroxilas nas posições 5, 7 e 4' substituídas ao mesmo tempo, já que para a formação da estrutura quinoidal, responsável pela cor, um dos grupos hidroxila deve permanecer livre numa dessas posições (BROUILLARD, 1982).

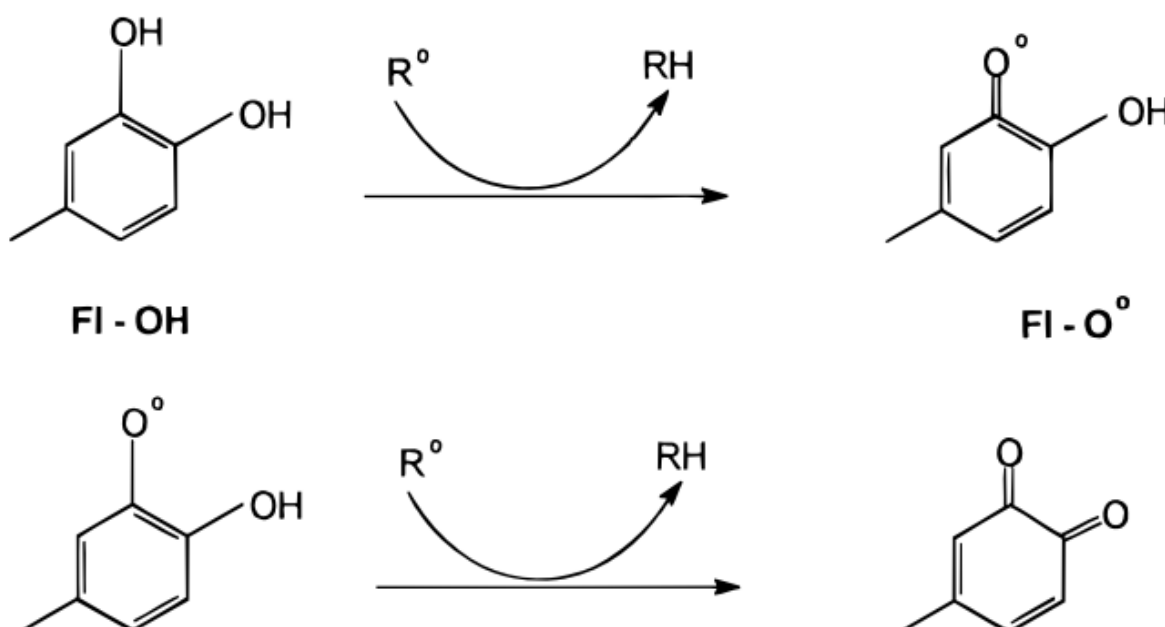
Esta estrutura justifica a grande diversidade de antocianinas existentes na natureza. Na década de 90, Henry (1992) reportou a identificação de aproximadamente 300 antocianinas diferentes, número atualizado para 400, por Kong *et al.* (2003). Em revisão sobre o tema, Lima e Guerra (2003) relataram que os compostos antociânicos estão presentes em diversos alimentos consumidos no Brasil, tais como açaí, acerola, ameixa, amora, feijão preto, frutos de baguaçu, jambolão e película de pedúnculo de caju. Os mesmos autores também reportaram a presença em outros produtos alimentícios, tais como batata doce roxa, berinjela, batata vermelha, casca de maçã, casca de maracujá roxo, casca de manga, cebola roxa, cerejas ácida e doce, folhas de ruibarbo e rabanete, framboesa, groselha, jambo do Pará, morango, pitanga roxa, repolho roxo e uva.

Convém ressaltar que os flavonóides são os principais agentes antioxidantes presentes na dieta e sua natureza química tem sido frequentemente relacionada à proteção contra os radicais livres (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000; NÚNEZ-SÉLLES, 2005).

### 3.4.1 Ação antioxidante

Radicais livres são moléculas instáveis que apresentam um elétron isolado, livre para se ligar a outros elétrons, por este motivo, possuem elevada reatividade, sendo capazes de provocar a oxidação nos sistemas biológicos do organismo. Embora sejam importantes para a renovação celular e sistema imunológico (em quantidades reduzidas), quando em excesso, podem ocasionar mutações no DNA das células e destruir os lipídios que compõem a estrutura das membranas celulares (GILGUN-SHERKI *et al.*, 2002; MARTI *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2006). Os mecanismos antioxidantes envolvem a supressão da formação e ação dos radicais livres, o sequestro das espécies reativas de oxigênio e a regulação do sistema antioxidante (HALLIWELL, 1994). Os flavonoides (FI-OH), grupo que inclui as antocianinas, são termodinamicamente capazes de reduzir a oxidação dos radicais livres por meio da doação de um átomo de hidrogênio. O radical que resulta dessa doação (FI-O) pode reagir com um segundo radical (Figura 5) (PIETTA, 2000).

Figura 5 - Capacidade de sequestro de radicais livres dos flavonoides.



FI-O°: radical resultante da oxidação dos flavonoides; FI-OH: flavonoides; R°: radical livre; RH: radical livre reduzido.

Fonte: adaptado de Pietta (2000).

Uma propriedade apreciável das antocianinas é a sua atividade antioxidante, que minimiza os danos causados pelos radicais livres (PATRAS *et al.*, 2010), possibilitando o atraso ou inibição do início ou propagação das reações de oxidação em cadeia, as quais levam à lesão celular (CARVALHO *et al.*, 2006). Pietta (2000) ressalta que a primeira fase de defesa antioxidante dos flavonoides ocorre no trato digestivo, limitando a formação de espécies reativas de oxigênio e sequestrando-as. Uma vez absorvidos, tanto sob a forma de aglicona quanto de glicosídeo, continuam a exercer seus efeitos antioxidantes. Conseqüentemente, sua ingestão contínua contribui para a saúde humana por meio da proteção contra os danos oxidativos a componentes celulares, efeitos anti-inflamatórios e prevenção de doenças crônicas não transmissíveis (VALDUGA *et al.*, 2009; VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009), sejam neuronais, cardiovasculares, câncer, diabetes ou outras (PATRAS *et al.*, 2010).

Antioxidantes sintéticos como butil hidroxianisol (BHA) e butil hidroxitolueno (BHT) são largamente empregados aos alimentos para prevenir deteriorações oxidativas. No entanto, propriedades carcinogênicas têm sido relatadas por ambos os compostos. Por este motivo, há um interesse crescente no uso de antioxidantes naturais, obtidos de fontes alternativas (BOTTERWERCK *et al.*, 2000). Nesse contexto, Balasundram, Sundram e Samman (2006) em artigo de revisão sobre a presença de compostos fenólicos em resíduos agroindustriais destacaram que esses materiais são boas fontes de polifenóis, podendo ser explorados como fonte de antioxidantes naturais. Por sua vez, Makris, Boskou e Andrikopoulos (2007) avaliaram a concentração de compostos fenólicos e as características antioxidantes de vários tipos de resíduos sólidos agroalimentares e ressaltaram que os resíduos vinícolas contêm quantidade elevada de polifenóis antioxidantes. Melo *et al.* (2011) analisando a composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais evidenciaram que esses materiais residuais, principalmente os vinícolas, são ricos em compostos bioativos, tais como os compostos fenólicos; e que por apresentarem atividade antioxidante, podem ser potenciais fontes naturais de substâncias bioativas para aplicação na indústria de alimentos.

Segundo Sánchez, Murillo e Méndez (2010) resíduos agroindustriais de frutas exibem uma forte associação entre o teor de fenólicos totais presentes e o potencial antioxidante. Correlações positivas entre o teor de antocianinas e a ação



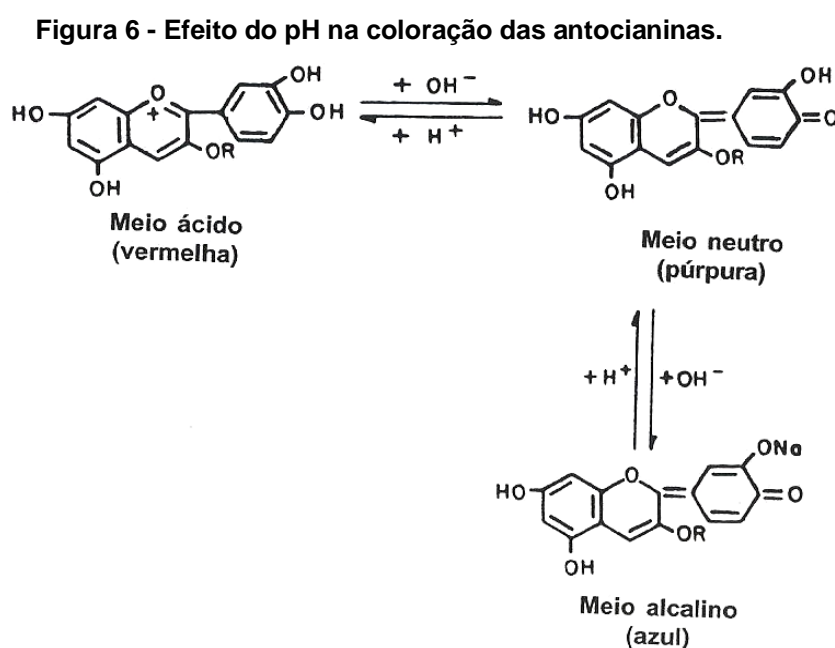
de sequestro de radicais livres também foram evidenciadas em alguns estudos envolvendo fontes vegetais distintas (ESPÍN *et al.*, 2000; MUÑOZ-ESPADA *et al.*, 2004; JIAO *et al.*, 2012; CUI *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2014). A presença de antocianinas em um significativo número de alimentos de origem vegetal e à diversidade de sua estrutura química tem motivado diversas pesquisas sobre a sua propriedade antioxidante (GARZÓN; RIEDL; SCHWARTZ, 2009; CEREZO *et al.*, 2010; HOGAN *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2011; YUAN *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012; MURTHY *et al.*, 2012; CUI *et al.*, 2013; PITIJA *et al.*, 2013). Essa propriedade pode ser influenciada por vários fatores, incluindo as características coloidais dos substratos, as condições e etapas de oxidação, a formação e estabilidade dos radicais, assim como a possível localização dos antioxidantes e estabilidade em diferentes fases do processamento de alimentos (ROCKENBACH *et al.*, 2008).

#### 3.4.2 Estabilidade e aplicação como corante natural

Na indústria de alimentos, os corantes artificiais são amplamente utilizados por apresentarem alta estabilidade e poder tintorial. Entretanto, ações legislativas que frequentemente proíbem o uso destes corantes como aditivos químicos, bem como a exigência do consumidor quanto à qualidade dos alimentos tem aumentado o interesse pelo desenvolvimento de corantes obtidos de fontes naturais tendo em vista a substituição dos artificiais (SAONA-RODRIGUEZ; GIUSTI; WROLSTAD, 1998). Vários estudos apontam o aparecimento de reações adversas decorrentes do consumo de corantes artificiais, destacando a ocorrência de reações tóxicas no metabolismo desencadeantes de alergias, alterações comportamentais e carcinogenicidade (STEFANI *et al.*, 2009; POLÔNIO; PERES, 2009; KOBYLEWSKI; JACOBSON, 2010; MPOUNTOUKAS *et al.*, 2010). Nesse sentido, o avanço alcançado pela indústria alimentícia é polêmico em razão da necessidade e segurança do emprego destes corantes aos alimentos. Ainda que existam razões tecnológicas, o seu uso exige cautela em virtude dos possíveis riscos toxicológicos associados ao consumo diário dessas substâncias (BRASIL, 2013). Em vista disso, cresce o interesse pelos pigmentos naturais, pois além da propriedade corante, estão vinculados às importantes atividades biológicas, uma

vez que os seus efeitos benéficos à saúde relacionam-se às suas propriedades antioxidantes (VALDUGA *et al.*, 2009; VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009). Além disso, em alguns casos, é capaz de competir com o corante artificial em termos de custo (HENRY, 1992; CONSTANT; STRINGHETA, SANDI, 2002).

O maior fator limitante para o uso das antocianinas é a sua menor estabilidade, quando comparada aos corantes sintéticos. As antocianinas, solúveis apenas em meios aquosos, sofrem mudança de cor em função do pH, fato que restringe o seu uso. Portanto, alguns fatores devem ser monitorados após processamento a fim de garantir uma melhor estabilidade desses pigmentos tendo em vista a conservação do aspecto sensorial dos produtos (LOPES *et al.*, 2007). Estes fatores incluem: estrutura química, pH, temperatura, luz, presença de oxigênio, degradação enzimática e possíveis interações entre os componentes dos alimentos, tais como ácido ascórbico, íons metálicos, açúcares e copigmentos (JACKMAN; SMITH, 1992; FRANCIS, 1989). Destes, o pH é o que mais compromete a coloração dos produtos. Em diferentes pH, os pigmentos antocianínicos se encontram em formas distintas e apresentam cores variadas. Em meio ácido, as antocianinas são geralmente de cor vermelha brilhante, com o aumento do pH, passam a ter uma estrutura quinoidal, púrpura, e em meio alcalino, a coloração modifica para azul (Figura 6) (HENRY, 1992; BOBBIO; BOBBIO, 2003).



Fonte: Bobbio e Bobbio (2003).

A ocorrência de acilação bem como a presença de açúcares na molécula de antocianina confere maior estabilidade a estes pigmentos. Por este motivo, as antocianidinas são menos estáveis do que as antocianinas (FRANCIS, 1992, 2000). Em estudo de revisão realizado por Lima e Guerra (2003) foi abordado que as antocianinas aciladas promovem uma melhor retenção de cor e aumento da estabilidade em pH alcalino ou sob a ação de outros fatores, como aquecimento, luz, e SO<sub>2</sub>. Do ponto de vista prático as antocianinas são utilizadas em produtos ácidos com pH igual ou menor a 4,0 em razão de alterações na tonalidade e intensidade de cor. Desse modo, algumas aplicações desse pigmento na indústria de alimentos incluem: refrigerantes, compotas de frutas (geleias), produtos lácteos, congelados e de confeitaria, misturas em pó para bebidas e sobremesas, e menos frequentemente, bebidas alcoólicas e produtos contendo vinagre. De modo geral, o requisito primordial para obter êxito no uso das antocianinas como corante orgânico natural é um baixo pH e a ausência de turbidez (HENRY, 1992).

Lopes *et al.* 2007 ressaltam que avaliar a potencialidade dos processos de extração, purificação e utilização das antocianinas em alimentos permanece ainda um campo aberto à investigação científica. Por esta razão, pesquisas vêm sendo conduzidas com o intuito de minimizar a perda de cor, bem como de avaliar os fatores envolvidos no processo de degradação desses pigmentos. Os aspectos relacionados à estabilidade das antocianinas têm sido amplamente investigados em materiais vegetais diversos, tais como pitanga roxa (LIMA; MÉLO; LIMA, 2005), açaí (PACHECO-PALENCIA; DUNCAN; TALCOTT, 2009), amora (ARAMWIT; BANG; SRICHANA, 2010), jabuticaba (SILVA *et al.*, 2010), morango (VERBEYST *et al.*, 2010), framboesa (VERBEYST *et al.*, 2011), tamarindo vermelho (MAYAVEL *et al.*, 2012), jambolão (SARI *et al.*, 2012) e batata doce (LI *et al.*, 2013). Assim, as antocianinas podem ser extraídas de vários alimentos de origem vegetal, e, conseqüentemente, do material residual oriundo da industrialização destes alimentos, a exemplo dos resíduos gerados pelo processamento de uva (GÓMEZ-PLAZA; MIÑANO; LÓPEZ-ROCA, 2006; PATRAS *et al.*, 2010; CLEMENTE; GALLI, 2011; IORA *et al.*, 2015).

## REFERÊNCIAS

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2013. 126p. Disponível em: <[http://www.gaz.com.br/tratadas/eo\\_edicao/4/2013/04/20130401\\_e36fb3c90/pdf/3853\\_fruticultura\\_2013.pdf](http://www.gaz.com.br/tratadas/eo_edicao/4/2013/04/20130401_e36fb3c90/pdf/3853_fruticultura_2013.pdf)>. Acesso em: 11 abr. 2013.

ARAMWIT, P.; BANG, N.; SRICHANA, T. The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits. **Food Research International**, v. 43, n. 4, p. 1093-1097, 2010.

AYALA-ZAVALA, J. F.; VEGA-VEGA, V.; ROSAS-DOMÍNGUEZ, C.; PALAFOX-CARLOS, H.; VILLA-RODRIGUEZ, J. A.; WASIM SIDDIQUI, Md.; DÁVILA-AVIÑA, J. E.; GONZÁLEZ-AGUILAR. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. **Food Research International**, v. 44, p. 1866-1874, 2011.

BABBAR, N.; OBEROI, H. S.; UPPAL, D. S.; PATIL, R. T. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. **Food Research International**, v. 44, p. 391-396, 2011.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. B. **Introdução à química de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2003. 238 p.

BOTTERWERCK, A. A.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHM, R. A.; KLEINJANS, J.; VAN DEN BRANDT, P. A. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study. **Food and Chemical Toxicology**, v., 38, n. 7, p. 599-605, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 jan. 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamentação de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia no Brasil. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/iET>>. Acesso em: 16 ago. 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 28 out. 1997.

BRASIL. Lei nº 12.305, de 08 de fevereiro de 2010. Institui a política Nacional de resíduos sólidos; altera a lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 ago. 2010a. p. 2.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Comunicação Social. **A força da agricultura 1860 – 2010**. Brasília: MAPA, 2010b. 68p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 01, de 7 de janeiro de 2000. Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de e suco de frutas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 jan. 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 55, de 27 de julho de 2004. Normas referentes à complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho e dos derivados da uva e do vinho. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 jul. 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Política Agrícola. Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura. Série

Agronegócios. **Cadeia produtiva de frutas**. v. 7. Brasília: IICA: MAPA/SPA, 2007. 102p. Disponível em: <[http://www.ibraf.org.br/x\\_files/Documentos/Cadeia\\_Produtiva\\_de\\_Frutas\\_S%C3%A9rie\\_Agroneg%C3%B3cios\\_MAPA.pdf](http://www.ibraf.org.br/x_files/Documentos/Cadeia_Produtiva_de_Frutas_S%C3%A9rie_Agroneg%C3%B3cios_MAPA.pdf)>. Acesso em: 11 abr. 2013.

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

BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, 1982. p. 1-39.

CAMARGO, U. A. In: MELLO, L. M. R; MACHADO, C. A. E. **Cadastro vitícola do Rio Grande do Sul: 2005 a 2007**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho: Ibravin, 2008. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/pesquisa/cadastro/cds/2005-2007/html/index.html>>. Acesso em: 14 abr. 2014.

CAMARGO, U. A. 'Isabel Precoce': alternativa para a vitivinicultura brasileira. **Comunicado Técnico**, n. 54. 1. ed. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. 6p. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot054.pdf>>. Acesso em: 14 abr. 2014.

CAMARGO, U. A; MAIA; J. D. G.; NACHTIGAL, J. C. BRS VIOLETA: nova cultivar de uva para suco e vinho de mesa. **Comunicado Técnico**, n. 63. 1. ed. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2005. 8p. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot063.pdf>>. Acesso em: 29 mar. 2014.

CARVALHO, P. G. B.; MACHADO, C. M. M.; MORETTI, C. L.; FONSECA, M. E. N. Hortaliças como alimentos funcionais. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 4, 2006.

CAYUELA, M. L.; MILLNER, P. D.; MEYER, S. L. F.; ROIG, A. Potential of olive mill waste and compost as biobased pesticides against weeds, fungi, and nematodes. **Science of the Total Environment**, v. 399, p. 11-18, 2008.

CEREZO, A. B.; CUEVAS, E.; WINTERHALTER, P.; GARCIA-PARRILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M. Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in *Camarosa* strawberry. **Food Chemistry**, v. 123, p. 574-582, 2010

CLEMENTE, E.; GALLI, D. Stability of the anthocyanins extracted from residues of the wine industry. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 3, p. 765-768, 2011.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Conjuntura mensal: derivados da uva. Período: jan. a dez. de 2013. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_05\\_06\\_16\\_47\\_31\\_derivadosdauvajaneirodezembro2013.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_05_06_16_47_31_derivadosdauvajaneirodezembro2013.pdf)>. Acesso em: 02. mai. 2014.

CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes alimentícios. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 203-220, 2002.

CUI, C.; ZHANG, S.; YOU, L.; REN, J.; LUO, W.; CHEN, W.; ZHAO, M. Antioxidant capacity of anthocyanins from *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) and identification of the major anthocyanins. **Food Chemistry**, v. 139, p. 1-8, 2013.

ESPÍN, J. C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H. J.; GARCÍA-VIGUERA, C. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1588-1592, 2000.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

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

FRANCIS, F. J. Food colorants: anthocyanins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 28, n. 4, p. 273-314, 1989.

FRANCIS, F. J. Miscellaneous colorants. In: HENDRY, G. A. F. **Natural food colorants**. New York: AVI, 1992. p. 243-280.

FRANCIS, F. J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. **Cereal Foods World**, v. 45, p. 208-213, 2000.

GARCÍA-LOMILLO, J.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L.; PINO-GARCÍA, R.; RIVERO-PÉREZ, M. D.; MUÑIZ-RODRÍGUEZ, P. Antioxidant and antimicrobial properties of wine byproducts and their potential uses in the food industry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 52, p. 12595-12602, 2014.

GARZÓN, G. A.; RIEDL, K. M.; SCHWARTZ, S. J. Determination of anthocyanins, total phenolic content, and antioxidant activity in Andes berry (*Rubus glaucus* Benth). **Journal of Food Science**, v. 74, n. 3, p. C227-C232, 2009.

GILGUN-SHERKI, Y.; ROSENBAUM, Z.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. **Pharmacological Reviews**, v. 54, n. 2, p. 271-284, 2002.

GIOIA, D. D.; SCIUBBA, L.; SETTI, L.; LUZIATELLI, F.; RUZZI, M.; ZANICHELLI, D.; FAVA, F. Production of biovanillin from wheat bran. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, v. 4, p. 498-505, 2007.

GIOVANNINI, E. **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. 2. ed. Porto Alegre: Renascença, 2005. 368p.



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

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **The lancet**, v. 344, p. 721-724, 1994.

HENRY, B. S. Natural food colours. In: HENDRY, G. A. F. **Natural food colorants**. New York: AVI, 1992. p. 39-78.

HOGAN S.; CHUNG, H.; ZHANG, L.; LI, J.; LEE, Y.; DAI, Y.; ZHOU, K. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 208-214, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção agrícola municipal**: culturas temporárias e permanentes. Rio de Janeiro: IBGE, 2010. v. 37, 91p. Disponível em: <[http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam\\_2010\\_v37\\_br.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2010_v37_br.pdf)>. Acesso em: 13 abr. 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção agrícola municipal**: culturas temporárias e permanentes. Rio de Janeiro: IBGE, 2013. v. 40, 102p. Disponível em: <[http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam\\_2013\\_v40\\_br.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2013_v40_br.pdf)>. Acesso em: 18 dez. 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO (IBRAVIN). Principais regiões produtoras: viticultura tropical. IBRAVIN, 2010. Disponível em: <<http://www.ibravin.com.br/regioesprodutoras.php>>. Acesso em: 16 abr. 2014.

IORA, S. R. F.; MACIEL, G. M.; ZIELINSKI, A. A. F.; SILVA, M. V.; PONTES, V. A.; HAMINIUK, C. W. I; GRANATO, D. Evaluation of the bioactive compounds and

the antioxidant capacity of grape pomace. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 1, p. 62–69, 2015.

JACKMAN, R. L.; SMITH, J. L. Anthocyanins and betalains. In: HENDRY, G. A. F. **Natural food colorants**. New York: AVI, 1992. p. 183-241.

JIAO, Y.; JIANG, Y.; ZHAI, W.; YANG, Z. Studies on antioxidant capacity of anthocyanin extract from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 27, p. 7046-7054, 2012.

KOBYLEWSKI, S.; JACOBSON, M. F. **Food dyes: a rainbow of risks**. Center for Science in the Public Interest (CSPI), jun., 2010. Disponível em: <<http://cspinet.org/new/pdf/food-dyes-rainbow-of-risks.pdf>>. Acesso em: 09 set. 2013.

KONG, J. M.; CHIA, L. M.; GOH, N. K.; CHIA, T. F.; BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, p. 923-933, 2003.

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

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 167-198, 2003.

LI, H.; DENG, Z.; ZHU, H.; HU, C.; LIU, R.; YOUNG, J. C.; TSAO, R. Highly pigmented vegetables: Anthocyanin compositions and their role in antioxidant activities. **Food Research International**, v. 46, n. 1, p. 250-259, 2012.

LI, J.; LI, X.; ZHANG, Y.; ZHENG, Z.; QU, Z.; LIU, M.; ZHU, S.; LIU, S.; WANG, M.; QU, L. Identification and thermal stability of purple-fleshed sweet potato

anthocyanins in aqueous solutions with various pH values and fruit juices. **Food Chemistry**, v. 136, n. 3-4, p. 1429-1434, 2013.

LIMA, V. L. A. G.; GUERRA, N. B. Antocianinas: atividade antioxidante e biodisponibilidade. **Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 37, p. 121-128, 2003.

LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A.; PINHEIRO, I. O.; GUERRA, N. B. Antioxidant capacity of anthocyanins from acerola genotypes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 86-92, 2011.

LIMA, V. L. A. G., MÉLO, E. A.; LIMA, D. E. S. Efeito da luz e da temperatura de congelamento sobre a estabilidade das antocianinas da pitanga roxa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 92-94, 2005.

LIMA, M. S.; SILANI, I. S. V.; TOALDO, I. M.; CORRÊA, L. C.; BIASOTO, A. C. T.; PEREIRA, G. E.; BORDIGNON-LUIZ, M.; 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.

LOPES, J. T.; XAVIER, M. F.; QUADRI, M. G. N.; QUADRI, M. B. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, n. 3, p. 291-297, 2007.

LORENZI, H.; SARTORI, S.; BACHER, L. B.; LACERDA, M. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: (de consumo *in natura*)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 640 p.

MAIA, J. D. G.; PEREIRA, G. E.; MONTEIRO, F. P.; SOUZA, R. T.; LAZZAROTTO, J. J.; OLIVEIRA, J. B.; RITACHEL, P. Novas cultivares brasileiras de uvas para elaboração de suco no semiárido brasileiro: desempenho Agrônômico e qualidade do suco. **Circular Técnica**, n. 96. 1. ed. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2013. 24p. Disponível em:

<<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/circular/cir096.pdf>>. Acesso em: 17 abr. 2014.

MAKRIS, D. P.; BOSKOU, G.; ANDRIKOPOULOS, N. K. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 2, p. 125-132, 2007.

MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Characterization of polyphenolic phytochemicals in red grape pomace. **International Journal of Waste Resources**, v. 3, n. 2, p. 1-4, 2013.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 659-664, 2005.

MARTI, A.; MORENO-ALIAGA, M. J.; ZULET, M. A.; MARTÍNEZ, J. A. Avances en nutrición molecular: nutrigenómica y/o nutrigenética. **Nutrición Hospitalaria**, v. 20, n. 3, 2005.

MAYAVEL, A.; GURUDEV SINGH, B.; DURAI, A.; MURUGEASAN, S. Evaluation of colour and stability of anthocyanin in red tamarind (*Tamarindus indica* L). **International Journal of Advanced Life Sciences**, v. 5, n. 2, p. 137-144, 2012.

MELLO, L. M. R. Vitivinicultura brasileira: Panorama 2012. **Comunicado Técnico**, n. 137. 1. ed. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2013. 5p. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot137.pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2014.

MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K. B.; TIVERON, A. P.; MASSARIOLI, A. P.; OLDONI, T. L. C.; ZANUS, M. C.; PEREIRA, G. E.; ALENCAR, S. M. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p. 1088-1093, 2011.

MPOUNTOUKAS, P.; PANTAZAKI, A.; KOSTARELI, E.; CHRISTODOULOU, P.; KARELI, D.; POLILIOU, S.; MOURELATOS, C.; LAMBROPOULOU, V.; LIALIARIS, T. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2934-2944, 2010.

MUÑOZ-ESPADA, A. C.; WOOD, K. V.; BORDELON, B.; WATKINS, B. A. Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of Concord, Norton, and Marechal Foch grapes and wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6779-6786, 2004.

MURTHY, P. S.; MANJUNATHA, M. R.; SULOCHANNAMA, G.; NAIDU, M. M. Extraction, characterization and bioactivity of coffee anthocyanins. **European Journal of Biological Sciences**, v.4, n. 1, p. 13-19, 2012.

NÚÑEZ-SÉLLES, A. J. Antioxidants therapy: myth or reality? **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, 2005.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; DUNCAN, C. E.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1199-1205, 2009.

PARAWIRA, W.; READ, J. S.; MATTIASSON, B.; BJÖRNSSON, L. Energy production from agricultural residues: high methane yields in pilot stage anaerobic digestion. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 44-50, 2008.

PATRAS, A.; BRUNTON, N. P.; O'DONNELL, C.; TIWARI, B. K. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 3-11, 2010.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do

impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, v. 2, n. 1, p. 118-127, 2007.

PFALTZGRAFF, L. A.; DE BRUYN, M.; COOPER, E. C.; BUDARIN, V.; CLARK, J. H. Food waste biomass: a resource for high-value chemicals. **Green Chemistry**, v. 15, p. 307-314, 2013.

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

PITIJA, K.; NAKORNRIAB, M.; SRISEADKA, T.; VANAVICHIT, A.; WONGPORNCHAI, S. Anthocyanin content and antioxidant capacity in bran extracts of some Thai black rice varieties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 300-308, 2013.

POLÔNIO, M. L. T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25, n. 8, p. 1653-1666, 2009.

PONTES, P. R. B.; SANTIAGO, S. S.; SZABO, T. N.; TOLEDO, L. P.; GOLLÜCKE, A. P. B. Atributos sensoriais e aceitação de sucos de uva comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 313-318, 2010.

POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food: practical applications**. Boca Raton: CRC Press LLC, 2001. 380 p.

HENDRY, G. A. F. **Natural food colorants**. New York: AVI, 1992. p. 243-280.

PROTAS, J. F. S; CAMARGO, U. A. A vitivinicultura do Vale do Sub-Médio São Francisco. In: PROTAS, J. F. S; CAMARGO, U. A. A. **Vitivinicultura brasileira: panorama setorial de 2010**. Brasília: SEBRAE; Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho: Ibravin; 2011. p. 95-102.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A.; MELLO, L. M. R. **A vitivinicultura brasileira**: realidade e perspectivas. Artigos técnicos. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2002. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/vitivinicultura/>>. Acesso em: 29 mar. 2014.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO. **Suco de uva**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. 45p.

ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 238-244, 2008.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; WROLSTAD, R. E. Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. In: WROLSTAD, R. E. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001. p. F1.1.1-F1.1.10.

ROSA, M. F.; SOUZA FILHO, M. S. M.; FIGUEIREDO, M. C. B.; MORAIS, J. P. S.; SANTAELLA, S.T.; LEITÃO, R.C. Valorização de resíduos da agroindústria. In: II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais. **Palestras...** Foz do Iguaçu: SIGERA, 2011. p. 98-105.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 19-34, 2002.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, v. 130, n. 8S, p. 2073S-2085S, 2000.

SÁNCHEZ, W. F.; MURILLO, E.; MÉNDEZ, J. J. Potencial antioxidante de residuos agroindustriales de tres frutas de alto consumo en el Tolima. **Scientia et Technica**, v. XVII, n. 46, p. 138-143, 2010.

SAONA-RODRIGUEZ, L. E.; GIUSTI, M.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanin pigment composition of red-fleshed potatoes. **Journal of Food Science**, v. 63, p. 458-465, 1998.

SARI, P.; WIJAYA, C. H.; SAJUTHI, D.; SUPRATMAN, U. Colour properties, stability, and free radical scavenging activity of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit anthocyanins in a beverage model system: natural and copigmented anthocyanins. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1908-1914, 2012.

SGARBIERI, V. C.; PACHECO, M. T. B. Revisão: alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 2, n. 1-2, p.7-9, 1999.

SILVA, G. J. F.; CONSTANT, P. B. L.; FIGUEIREDO, R. W.; MOURA, S. M. Formulação e estabilidade de corantes de antocianinas extraídas das cascas de jabuticaba (*Myrciaria ssp.*). **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 3, p. 429-436, 2010.

STEFANI, G. P.; HIGA, M.; PASTORINO, A. C.; CASTRO, A. P. B. M.; FOMIN, A. B. F.; JACOB, C. M. A. Presença de corantes e lactose em medicamentos: avaliação de 181 produtos. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 32, n. 1, p. 18-26, 2009.

TORRES, B. R.; ALIAKBARIAN, B.; TORRE, P.; PEREGO, P.; DOMÍNGUEZ, J. M.; ZILLI, M.; CONVERTI, A. Vanillin bioproduction from alkaline hydrolyzate of corn cob by *Escherichia coli* JM109/pBB1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 3, p. 154-158, 2009.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; LUCCIO, M. D.; FÚRIGO JÚNIOR, A. Carotenoids production: microorganisms as source of natural dyes. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.

VERBEYST, L.; CROMBRUGGEN, K. V.; PLANCKEN, I. V.; HENDRICKX, M.; LOEY, A. V. Anthocyanin degradation kinetics during thermal and high pressure



treatments of raspberries. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 3, p. 513-521, 2011.

VERBEYST, L.; OEY, I.; PLANCKEN, I. V.; HENDRICKX, M.; LOEY, A. V. Kinetic study on the thermal and pressure degradation of anthocyanins in strawberries. **Food Chemistry**, v. 123, n. 2, p. 269-274, 2010.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.

YUAN, W.; ZHOU, L.; DENG, G.; WANG, P.; CREECH, D.; LI, S. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity of *Vaccinium* L. in Texas, USA. **Pharmaceutical Crops**, v. 2, p. 11-23, 2011.

## **4. RESULTADOS**

---

---

# **CAPÍTULO I**

---

## **ARTIGO I:**

IDENTIFICAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E POTENCIAL  
ANTIOXIDANTE DE ANTOCIANINAS DO RESÍDUO  
AGROINDUSTRIAL DE SUCO DE UVA cv. ISABEL

## RESUMO

Considerando o grande volume de resíduos sólidos gerado em razão das atividades agroindustriais, bem como a recuperação de substâncias bioativas que, possivelmente, estão presentes neste material, este trabalho teve como objetivo identificar e quantificar as antocianinas do resíduo agroindustrial de suco de uva bem como avaliar a sua atividade antioxidante. O resíduo de uva (*Vitis labrusca*, cv. Isabel) foi cedido por uma indústria produtora de suco de uva integral, situada na região do Vale do São Francisco, na cidade de Petrolina-PE. O teor de antocianinas totais foi determinado utilizando metodologia de pH diferencial, e a purificação desses pigmentos foi realizada por meio de extração em fase sólida (SPE), utilizando cartuchos C<sub>18</sub>, procedimento que promoveu a remoção de açúcares, ácidos e compostos fenólicos não antociânicos. Análises cromatográficas foram efetuadas para identificação e quantificação das antocianinas individuais por meio de sistema CLAE-DAD em fase reversa. A atividade antioxidante das antocianinas foi avaliada quanto à capacidade de sequestrar os radicais DPPH<sup>•</sup> (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e ABTS<sup>•+</sup> [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácidosulfônico)], tendo o ácido gálico como composto de referência. O teor médio de antocianinas totais foi de 31,66 ± 0,63 mg. 100g<sup>-1</sup> de resíduo (expresso em malvidina-3-glicosídeo). Seis antocianinas majoritárias foram identificadas: cianidina-3-O-glicosídeo; delphinidina-3-O-glicosídeo; malvidina-3-O-glicosídeo; malvidina-3,5-O-glicosídeo; pelargonidina-3-O-glicosídeo; e peonidina-3-O-glicosídeo, em diferentes concentrações. Malvidina-3-O-glicosídeo foi a mais abundante (61,66%) seguida da malvidina-3,5-O-diglicosídeo (14,88%). A fração antociânica demonstrou elevado potencial antioxidante frente ao radical DPPH<sup>•</sup> (EC<sub>50</sub>: 0,26 g. g DPPH<sup>•-1</sup>; T<sub>EC50</sub>: 1,37 minutos; EA: 2,79). Aos 5 minutos de reação, em diferentes concentrações (5 a 40 µg. mL<sup>-1</sup>), apresentou variações no percentual de sequestro entre 48 e 94%, respectivamente, constatando-se uma alta correlação entre o teor de antocianinas e a capacidade antioxidante (R = 0,93). Frente ao radical ABTS<sup>•+</sup> as antocianinas exibiram significativa ação na captura do radical com valor de 199,35 µM Trolox. g<sup>-1</sup>. Conclui-se que as antocianinas do resíduo de uva avaliado constitui uma opção para o reaproveitamento de subprodutos vitícolas, apresentando-se como uma alternativa de corante natural com propriedades antioxidantes e com potencial aplicação na indústria de alimentos.

**Palavras-chave:** *Vitis labrusca*; Sequestro de radicais livres; DPPH<sup>•</sup>; ABTS<sup>•+</sup>.

## ABSTRACT

Considering the large volume of solid waste generated due to the agro-industrial activities, as well as the recovery of bioactive substances that are possibly present in this material, this study aimed to identify and quantify the anthocyanins found in the grape juice pomace, and evaluate the antioxidant activity of this purified fraction. The grape residue (*Vitis labrusca*, cv. Isabella) was ceded by an industry producing of pure grape juice, located in the region Sub-middle São Francisco Valley, in the city of Petrolina-PE. The anthocyanin content was determined using pH-differential method, and the purification of these pigments was performed by solid phase extraction (SPE) using C<sub>18</sub> cartridges, procedure which removed sugars, acids and non-anthocyanin phenolic compounds. The isolated anthocyanin were identified and quantified by a RP-HPLC with diode array detector. The antioxidant activity of the purified anthocyanins were evaluated for their ability to scavenge free radicals: DPPH<sup>•</sup> (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and ABTS<sup>•+</sup> [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)], using gallic acid as standard. The average content of anthocyanins was  $31.66 \pm 0.63$  mg. 100g<sup>-1</sup> residue (expressed as malvidin-3-glucoside). A total of six majority different anthocyanins were identified: cyanidin-3-O-glucoside, delphinidin-3-O-glucoside, malvidin-3-O-glucoside, malvidin-3,5-O-diglucoside, pelargonidin-3-O-glucoside and peonidin-3-O-glucoside, with different concentrations. Malvidin 3-glucoside was the most abundant (61.66%) of the total observed, while malvidin-3,5-O-diglucoside (14.88%) was the second. The anthocyanin fraction showed high antioxidant potential against the radical DPPH<sup>•</sup> (EC<sub>50</sub>: 0,26 g. g DPPH<sup>•-1</sup>; T<sub>EC50</sub>: 1,37 minutos; AE: 2,79). After 5 minutes of reaction at different concentrations (5-40 µg. mL<sup>-1</sup>), showed variations in the percentage scavenging between 48 and 94%, respectively, though there is a high correlation between anthocyanin content and antioxidant capacity (R = 0.93). Against the radical ABTS<sup>•+</sup> anthocyanins exhibited significant action in capturing the radical with value of 199.35 uM Trolox. g<sup>-1</sup>. It is concluded that the anthocyanin of the grape residue is an option for the reuse of wine byproducts, presenting itself as a natural antioxidant alternative with potential application in the food industry.

**Keywords:** *Vitis labrusca*; Free radical scavenging; DPPH<sup>•</sup>; ABTS<sup>•+</sup>.

## INTRODUÇÃO

O metabolismo normal das células aeróbicas leva à geração de uma série de radicais livres, incluindo as espécies reativas de oxigênio. A interação (em excesso) dessas espécies com moléculas de natureza lipídica origina novos compostos: hidroperóxidos e peróxidos diferentes. Desta forma, a relação desses radicais com os sistemas biológicos pode ser citotóxica e ocasionar lesões ao DNA e demais componentes da célula. O acúmulo desses produtos lesionados no organismo pode ser crítico para a degeneração celular no processo de envelhecimento, assim como para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, a exemplo de câncer, aterosclerose e diabetes (HALLIWELL, 1994, 1996; BIANCHI; ANTUNES, 1999; ANDERSON, 2000).

Os danos celulares causados pelos radicais livres podem ser prevenidos ou atenuados por meio da capacidade antioxidante de alguns compostos (CARVALHO *et al.*, 2006). Os polifenóis antioxidantes funcionam como sequestradores de radicais e, algumas vezes, como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (McANLIS *et al.*, 1997; MORAES; COLLA, 2006). Compostos fenólicos, grupo que inclui as antocianinas, têm sido reportados na literatura por possuírem ação antioxidante *in vivo* e *in vitro*, e dessa forma, serem capazes de inativar os radicais livres em meio aquoso e lipofílico (HARTMAN; SHANKEL, 1990; ANDERSON *et al.*, 2000; GILGUN-SHERKI *et al.*, 2002, LIONETTO *et al.*, 2011; ABBASI *et al.*, 2015).

Dentre os métodos comumente empregados para avaliar a capacidade antioxidante em alimentos e sistemas biológicos, destacam-se os que utilizam os radicais livres orgânicos sintéticos DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup> (SÁNCHEZ-MORENO, 2002; PÉREZ-JIMENEZ; SAURA-CALIXTO, 2006), tanto pela facilidade de execução como pela boa correlação com as demais metodologias antioxidantes (SOUSA; VIEIRA; LIMA, 2011). O radical cromóforo monocatiônico, gerado pela oxidação do ABTS<sup>•+</sup> com persulfato de potássio, desencadeia a abstração do hidrogênio, doador de elétrons, da substância antioxidante (RE, *et al.*, 1999). De forma semelhante, o ensaio da capacidade de sequestro do radical DPPH<sup>•</sup> baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para o DPPH<sup>•</sup>, convertendo-o a sua forma reduzida (picrilhidrazina) (BRAND-WILLIAMS, CUVÉLIER; BERSET, 1995). Em ambas as reações, a cor da solução é

suprimida, sendo o grau da descoloração utilizado para avaliar a habilidade do antioxidante em capturar o radical livre.

Os polifenóis estão amplamente distribuídos no reino vegetal. Entre as frutas, a uva (*Vitis* spp.) constitui uma fonte importante desses compostos (VACCARI; SOCCOL; IDE, 2009). Também se destaca por ser uma das frutas mais cultivadas no mundo, sendo o Brasil, em 2013, classificado como décimo maior produtor (FAO, 2013), e destinadas para a produção de vinho, sucos e derivados. Os sucos de uva brasileiros são produzidos a partir de uvas híbridas americanas (*Vitis labrusca*), especialmente da variedade Isabel, cultivar mais plantada em estados e regiões brasileiras caracteristicamente produtoras de uva, tais como Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Vale do São Francisco (LIMA *et al.*, 2014). A fabricação de suco de uva vem crescendo há alguns anos no Brasil em razão de sua tipicidade, qualidade e valor nutritivo (RIZZON; MIELE, 2012). Em 2012, apenas nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, esta produção representou cerca de 40% (224,98 milhões de litros) de um total de 600,49 milhões de litros destinados à fabricação de produtos derivados da uva, observando-se um acréscimo de 22,57% em relação à média (489,91 milhões de litros) dos anos anteriores (2008 a 2011) (MELLO, 2013) o que origina, por sua vez, um grande volume de resíduos sólidos.

A presença de polifenóis em subprodutos da indústria vinícola, tais como: flavonoides (antocianinas e flavonóis); ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzoicos); estilbenos (resveratrol) e taninos; e o efeito sinérgico entre eles, tem sido relacionado à propriedade antioxidante (FONTANA; ANTONIOLLI; BOTTINI, 2013; KY *et al.*, 2014). Por este motivo, o extrato bruto de resíduo de vinho tinto tem sido investigado para avaliação dessa propriedade (MAKRIS; KEFALAS, 2013; GARCÍA-LOMILLO *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2014; 2015), porém ainda há pouca informação sobre a ação antioxidante de antocianinas purificadas de subprodutos de uva. Estudos envolvendo ação antioxidante de antocianinas isoladas de resíduos de uva decorrentes da produção de suco também são escassos na literatura. Nesse contexto, este estudo objetivou identificar e quantificar as antocianinas do resíduo agroindustrial de suco de uva cv. Isabel e avaliar a capacidade antioxidante desta fração purificada, empregando métodos baseados na captura de radicais livres.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

#### *Amostras*

O resíduo de uva (*Vitis labrusca*, cv. Isabel) foi cedido por uma indústria produtora de suco de uva integral, situada na região do Vale do São Francisco, na cidade de Petrolina-PE (Latitude Sul 09° 21'; Longitude Oeste 40° 40'; Altitude de 360m). O suco foi obtido pelo processo de extração a quente sem prensagem do bagaço conforme descrito por Lima *et al.* (2014). As uvas, utilizadas para obtenção do suco e material residual, foram colhidas durante a safra do mês de outubro/2013. As amostras (5 kg), compostas por cascas e sementes, foram coletadas diretamente da linha de produção, acondicionadas em sacos de polietileno de baixa densidade, congeladas e transportadas, em caixas isotérmicas, até o Laboratório de Análises Físico-Químicas de Alimentos (LAFQA) do Departamento de Ciências Domésticas (DCD) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), onde foram imediatamente armazenadas sob congelamento ( $-18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), sendo descongeladas, conforme as quantidades necessárias para cada ensaio. Todos os procedimentos seguintes ocorreram em condições de reduzida luminosidade.

### Métodos

#### *Extração das antocianinas*

O resíduo de suco de uva foi extraído com acetona acidificada (0,01% HCl) e filtrado, subsequentemente, até a completa remoção das antocianinas. Os sobrenadantes resultantes foram submetidos à partição com dois volumes de clorofórmio e estocados a  $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  pelo período de uma noite, possibilitando a separação das fases apolar e polar. A fase aquosa foi centrifugada (6000rpm, 10 minutos,  $4^{\circ}\text{C}$ ), levada ao evaporador rotatório ( $38^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sob vácuo) para a remoção total da acetona residual, e o extrato aquoso obtido estocado a  $-18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  para as análises posteriores (RODRIGUEZ-SAONA; WROLSTAD, 2001).



### *Determinação das antocianinas totais*

A quantificação de antocianinas totais foi realizada de acordo com o método de pH diferencial (LEE; DURST; WROLSTAD, 2005). Os extratos antociânicos aquosos foram apropriadamente diluídos em tampões com pH 1,0 (cloreto de potássio, 0,025M) e pH 4,5 (acetato de potássio, 0,4M). Após 15 minutos de repouso a temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), as absorbâncias foram mensuradas em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650PC) a 520 nm e 700 nm. O teor dos pigmentos foi calculado considerando a absorvidade molar ( $\epsilon$ ) de  $28.000 \text{ L. cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$  e o peso molecular de  $493,2 \text{ g. mol}^{-1}$  da malvidina-3-glicosídeo, e os resultados foram expressos em mg de malvidina-3-glicosídeo.  $100 \text{ g}^{-1}$  de resíduo, aplicando a seguinte fórmula:

$$\text{Antocianinas monoméricas} = A \times \text{PM} \times \text{FD} \times 100 / \epsilon \times 1$$

Onde:  $A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1,0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4,5}$ ; PM é o peso molecular; FD é o fator de diluição;  $\epsilon$  é a absorvidade molar.

### *Purificação das antocianinas*

Extratos antociânicos aquosos foram purificados por meio de extração em fase sólida (SPE, *solid phase extraction*), utilizando cartuchos de  $\text{C}_{18}$  600mg (Alltech Assoc., Inc., Illinois, USA) segundo metodologia descrita por Rodriguez-Saona e Wrolstad (2001) para a remoção de açúcares, ácidos e outros compostos fenólicos não antociânicos. O extrato metanólico resultante foi concentrado a vácuo, em rota-evaporador ( $38^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), até a aquisição de um resíduo seco ao qual foi adicionado éter dietílico com a finalidade de precipitar os pigmentos (ESPÍN *et al.*, 2000). As antocianinas em pó obtidas, foram armazenadas sob congelamento ( $-18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) até o momento das determinações analíticas.

## *Identificação e quantificação das antocianinas por CLAE-DAD*

### a) Solventes

Metanol, acetonitrila e ácido fosfórico a 85 %, todos de grau cromatográfico, foram fornecidos pela Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil), JT Baker (Phillipsburg, NJ, USA) e Fluka (Switzerland), respectivamente, e a água ultrapura foi obtida da Purelab Option Q Elga System (USA).

### b) Padrões

Foram utilizados os seguintes padrões: cloreto de pelargonidina-3-O-glicosídeo (cloreto de calistefina), cloreto de cianidina-3,5-O-diglicosídeo (cloreto de cianina), cloreto de cianidina-3-O-glicosídeo (cloreto de curomanina), cloreto de malvidina-3-5-O-diglicosídeo (cloreto de malvina), cloreto de delphinidina-3-O-glicosídeo (cloreto de mirtilina), cloreto de malvidina-3-O-glicosídeo (cloreto de oenina), cloreto de peonidina-3-O-glicosídeo, obtidos da Extrasynthese (Genay, France). Soluções-estoque de cada padrão foram preparadas em metanol. Em seguida, uma solução padrão intermediária contendo todas as antocianinas estudadas foi preparada através da diluição das respectivas soluções-estoque em solução de ácido fosfórico a 0,85% (Tabela 1) (NATIVIDADE *et al.*, 2013).

### c) Amostras

Antocianinas purificadas (50 mg) foram acondicionadas em microtubo tipo eppendorf, coberto com papel alumínio, e transportadas, em caixa térmica de isopor, até o Laboratório de Cromatografia da Embrapa Semiárido (Petrolina-PE), onde foram realizadas as análises. Uma alíquota de 10 mg das antocianinas purificadas foi diluída em 1 mL da solução de ácido fosfórico a 0,85%, e filtrada em membrana de nylon de 0,45 µm (Allcrom-Phenomenex, EUA) antes de serem injetadas no CLAE-DAD.

## d) Procedimento analítico

A separação das antocianinas foi realizada segundo metodologia descrita por Natividade *et al.* (2013) em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Waters e2695 Separation Module Alliance), equipado com bomba quaternária, injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD) (Waters 2998), utilizando a coluna Gemini NX C<sub>18</sub> (150 mm x 4,6 mm x 3 µm) (Phenomenex, USA). A obtenção e processamento dos dados foram realizados utilizando o *software* "Waters Empower™ 2" (Milford, USA). As condições de análise foram: temperatura do forno a 40°C, volume de injeção de 10 µL, comprimento de onda a 520 nm e fluxo de 0,5 mL. min<sup>-1</sup>. A fase móvel foi constituída por solução de ácido fosfórico a 0,85% (fase A) e acetonitrila (fase B), conforme o seguinte gradiente: 0 min, 100% A; 10 min, 93% A e 7% B; 20 min, 90% A e 10% B; 30 min, 88% A e 12% B; 40 min, 77% A e 33% B; 45 min, 65% A e 35% B; 55 min, 100% B. A partir da curva de calibração ( $R^2 \geq 0,998$ ) dos padrões utilizados, empregando concentrações de 0,625 a 15 µg. mL<sup>-1</sup>, procedeu-se a identificação e quantificação das antocianinas.

**Tabela 1 Concentração das soluções-estoque e solução intermédia das antocianinas estudadas.**

Antocianinas	Solução-estoque (µg. mL <sup>-1</sup> )	Solução intermediária (µg. mL <sup>-1</sup> )
Cianidina-3,5-O- glicosídeo	2500	100
Cianidina-3-O- diglicosídeo	2500	100
Delphinidina-3-O- glicosídeo	2500	100
Malvidina-3,5-O- glicosídeo	2500	100
Malvidina-3-O- diglicosídeo	2500	50
Pelargonidina-3-O- glicosídeo	2500	25
Peonidina-3-O- glicosídeo	500	6,25

### *Avaliação da capacidade antioxidante*

#### a) Capacidade de sequestrar o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>)

A atividade antioxidante das antocianinas purificadas foi avaliada pelo método de sequestro de radical DPPH<sup>•</sup> descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), modificado por Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998). Antocianinas com diferentes concentrações foram adicionadas à solução de DPPH<sup>•</sup> em metanol (0,1M) atingindo as concentrações finais de 5; 7,5; 10; 15; 20; 30 e 40 µg. mL<sup>-1</sup>. A absorvância a 517 nm foi monitorada, em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650PC), até a reação atingir o platô de estabilidade.

A capacidade de sequestrar o radical DPPH<sup>•</sup>, aos 5 minutos de reação, utilizando as concentrações de antocianinas acima, foi calculada pela equação descrita por Miliauskas *et al.* (2004) e expressa como percentual de sequestro de radical livre, conforme a seguir:

$$\% \text{ de sequestro de radical livre} = \frac{(A_B - A_A) \times 100}{A_B}$$

Onde:  $A_B$  é a absorção do branco ( $t = 0$  minutos);  $A_A$  é a absorção de antocianinas ( $t = 5$  minutos).

A partir dos dados obtidos foi efetuada a análise de regressão simples com o objetivo de verificar a existência de uma relação funcional entre os valores de percentual de sequestro de radical livre DPPH<sup>•</sup> e o teor de antocianinas. Para estabelecer uma equação que representa essa relação foi construído um gráfico (diagrama de dispersão) para verificar como se comportam os valores de variável dependente (Y), percentual de sequestro de radical livre DPPH<sup>•</sup>, em função da variação da variável independente (X), teor de antocianinas, e assim obter um modelo matemático que melhor se ajuste aos valores observados de Y em função da variação dos valores da variável X.

A concentração do DPPH<sup>•</sup> remanescente no meio da reação foi calculada a partir da curva padrão do radical DPPH<sup>•</sup>, e o percentual de DPPH<sup>•</sup> remanescente

(DPPH<sup>\*</sup><sub>REM%</sub>) de cada concentração de antocianinas utilizando a seguinte expressão:

$$\text{DPPH}^*_{\text{REM}\%} = \text{DPPH}^*_t / \text{DPPH}^*_{T=0} \times 100$$

Onde: DPPH<sup>\*</sup><sub>t</sub> é a concentração do radical DPPH<sup>\*</sup> no tempo em que a reação atingiu o platô; DPPH<sup>\*</sup><sub>T=0</sub> é a concentração inicial do DPPH<sup>\*</sup> (tempo 0 da reação).

A concentração de antocianinas eficiente para diminuir em 50% a concentração inicial de DPPH<sup>\*</sup> (EC<sub>50</sub>) foi calculada a partir do gráfico da concentração da amostra *versus* DPPH<sup>\*</sup><sub>REM%</sub>, cujo resultado foi obtido em g amostra. g de DPPH<sup>\*</sup><sup>-1</sup> como também expresso em µg. mL<sup>-1</sup>. A eficiência antirradical (EA) foi calculada considerando o valor de EC<sub>50</sub> (g amostra. g de DPPH<sup>\*</sup><sup>-1</sup>) e o tempo em que foi atingido o EC<sub>50</sub> (T<sub>EC50</sub>), conforme a seguir:

$$\text{EA} = 1 / \text{EC}_{50} \times T_{\text{EC}50}$$

O comportamento cinético das antocianinas foi classificado em rápido (T<sub>EC50</sub> < 5 minutos), intermediário (T<sub>EC50</sub> = 5 a 30 minutos) ou lento (T<sub>EC50</sub> > 30 minutos), segundo o valor de T<sub>EC50</sub>, e a eficiência antirradical, em baixa (EA < 1), média (EA > 1 e ≤ 5), alta (EA > 5 e ≤ 10) ou super alta (EA > 10) de acordo com o valor de EA (SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998). Para fins de comparação, a capacidade de sequestro do radical DPPH<sup>\*</sup> também foi determinada nas mesmas condições utilizando o ácido gálico.

b) Capacidade de sequestrar o radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácidosulfônico) (ABTS<sup>•+</sup>)

A capacidade de sequestro do radical ABTS<sup>•+</sup> das antocianinas purificadas foi determinada segundo o método descrito por Re *et al.* (1999). O radical foi gerado a partir da reação da solução aquosa de ABTS<sup>•+</sup> (7 mM) com 2,45 mM de persulfato de potássio. Diferentes concentrações de antocianinas foram adicionadas a solução do ABTS<sup>•+</sup>, atingindo a concentração final de 0,5; 1,0; e 2,0

$\mu\text{g. mL}^{-1}$ , e sua absorvância registrada a 734 nm (após 6 minutos) em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650PC). A capacidade antioxidante da amostra foi calculada em relação à atividade do antioxidante sintético Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), que é uma substância hidrossolúvel análoga à vitamina E, e os resultados foram expressos em atividade antioxidante equivalente ao Trolox ( $\mu\text{M Trolox. g}^{-1}$ ). O ácido gálico foi utilizado como padrão com a finalidade de comparar sua capacidade sequestradora do radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  nas mesmas condições das antocianinas.

#### *Tratamento estatístico dos dados*

O experimento foi instalado segundo delineamento experimental inteiramente ao acaso. Todas as determinações foram efetuadas em triplicata e os resultados submetidos ao teste t de Student ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ), utilizando o *software* “Statistica” (versão 7, StatSoft, Inc., Tulsa, USA).

A análise de regressão linear simples foi efetuada com o auxílio do *software* “Microsoft Office Excel 2007” o que permitiu obter o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) que fornece informação ao resultado da análise de variância da regressão como uma maneira de se verificar se o modelo proposto é adequado ou não para descrever o fenômeno. Os valores próximos de 1 indicam que o modelo proposto é adequado para descrever o fenômeno, ou seja, as variáveis independentes podem prever e influenciar a variável dependente.

O coeficiente de correlação (R) também foi calculado utilizando o programa acima citado, podendo admitir valores positivos ou negativos, o que indica que a relação é direta ou inversa, respectivamente, e deve ser usado como uma medida de força da relação entre as variáveis.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Determinação das antocianinas totais

A molécula de antocianina apresenta caráter polar, permitindo a solubilização em diferentes solventes orgânicos, porém Rodriguez-Saona e Wrolstad (2001) referem que a acetona é capaz de recuperar 30% ou mais da fração antociânica quando comparada ao metanol. Tradicionalmente, soluções acidificadas têm sido usadas para a extração de antocianinas (JU; HOWARD, 2003).

Neste estudo, o teor médio de antocianinas totais presente no resíduo agroindustrial de suco de uva cv. Isabel foi de  $31,66 \pm 0,63$  mg.  $100\text{g}^{-1}$  de resíduo, expresso em malvidina-3-glicosídeo. Teor mais baixo foi encontrado por Clemente e Galli (2011) que utilizando resíduo industrial de vinho, composto pelas variedades Isabel (80%) e Bordô (20%) relataram um valor de  $26,20 \pm 2,65$  mg.  $100\text{g}^{-1}$  de resíduo. Soares *et al.* (2008) relataram que o teor de antocianinas totais encontrado em cascas de uvas da cultivar Isabel foi de  $82,15 \pm 21,55$  mg.  $100\text{g}^{-1}$  de peso fresco (correspondente à cianidina-3-glicosídeo), respectivamente. Além da distinta forma de expressão, esse valor elevado justifica-se por se tratar da casca da uva “in natura”, diferente da matéria prima deste estudo em que as cascas foram obtidas após serem submetidas ao processo de extração do suco.

Em uvas tintas, a concentração de antocianinas, geralmente, varia de 30 a 750 mg.  $100\text{g}^{-1}$  de fruta (MAZZA, 1995). Diversos fatores podem influenciar o acúmulo e a composição das antocianinas no fruto *in natura*, tais como: espécie, variedade, estágio de maturação, safra, região geográfica, condições edafoclimáticas e práticas agrícolas de modo geral, incluindo o processo de armazenamento (BRAVO, 1998; KIM; JEONG; LEE, 2003; MALACRIDA; MOTTA, 2005; RUBERTO *et al.*, 2007; ROCKENBACH *et al.*, 2008; RÍO SEGADE *et al.*, 2008); interferindo, portanto, no conteúdo de antocianinas presentes no resíduo, após o processamento do fruto.

Nesse sentido, Rockenbach *et al.* (2008) avaliando o teor de antocianinas em resíduo de uvas da espécie *Vitis vinifera*, variedades Ancelota e Tannat, extraídas em diferentes solventes, relataram que o maior teor desse pigmentos foi

encontrado utilizando como solvente o etanol 50%, cujo valores, calculado em peso seco, foi de 1950 e 770 mg. 100 g<sup>-1</sup>, respectivamente.

Considerando que a máxima extração de pigmentos antociânicos do mosto/vinho é alcançada durante os primeiros dias de fermentação alcoólica (GÓMEZ-PLAZA, MIÑANO E LÓPEZ-ROCA, 2006), e que o suco de uva caracteriza-se como uma bebida não fermentada (BRASIL, 2000), o resíduo de suco de uva possui uma maior perspectiva de obtenção de antocianinas. Essa afirmação foi confirmada por Li *et al.* (2013) que ao compararem amostras desidratadas de resíduos de uva, tanto da produção de suco como de vinho, variedades Kyoho e Cabernet Sauvignon, respectivamente, concluíram que em virtude do maior teor de antocianinas, o material residual da fabricação de suco consiste em uma melhor fonte desses compostos em relação ao vinícola. Clemente e Galli (2011) ressaltam que, dependendo do tipo de resíduo, a extração é capaz de recuperar cerca de 50% das antocianinas, o que justifica o crescente interesse na exploração de subprodutos de uvas.

O conteúdo de antocianinas totais do resíduo de suco de uva cv. Isabel encontrado neste estudo e avaliado pelo método de pH diferencial, foi mais expressivo em relação aos resíduos de polpas de goiaba ( $3,2 \pm 0,34$ ) e acerola ( $8,84 \pm 0,02$ ), expressos em  $\mu\text{g. } 100 \text{ g}^{-1}$  (SOUSA *et al.*, 2011). E, inferior às concentrações encontradas para cascas de jabuticaba ( $48,06 \pm 5,76 \text{ mg. } 100 \text{ g}^{-1}$ ) (SILVA *et al.*, 2010), bagaços de mirtilo ( $152 \text{ mg. } 100 \text{ g}^{-1}$  peso seco) (KHANAL; HOWARD; PRIOR, 2010), *cranberry* ( $121,40 \pm 5,90 \text{ mg. } 100 \text{ g}^{-1}$  peso seco) (WHITE; HOWARD; PRIOR, 2010), e amora ( $285,50 \pm 9,79 \text{ mg. } 100 \text{ g}^{-1}$ ) (ZHANG *et al.*, 2011). Além dos fatores anteriormente referenciados, os procedimentos de extração e quantificação interferem significativamente nestes valores. A respeito disso Lee, Rennaker e Wrolstad (2010) apontaram uma alta correlação ( $R \geq 0,925$ ) entre a metodologia de pH diferencial e HPLC. Segundo esses autores, na impossibilidade de análise por HPLC, o pH diferencial consiste em um método simples e econômico para determinar antocianinas totais. Teixeira, Stringheta e Oliveira (2008) também não encontraram diferenças significativas entre as metodologias de pH diferencial e pH único, sendo este último recomendado nos casos de ausência de interferentes na amostra (como por exemplo, taninos) em razão de sua praticidade.



## Identificação e quantificação das antocianinas por CLAE-DAD

Quimicamente, a estrutura das antocianinas difere entre si conforme o grau de hidroxilação e metoxilação, assim como o tipo, número e posição dos açúcares e ácidos alifáticos ou aromáticos ligados à molécula (LIMA; SUSSUCHI; GEOVANI, 2007). Ao analisar as antocianinas do resíduo agroindustrial de suco de uva cv. Isabel foi identificada a presença de seis compostos do total estudado, em diferentes tempos de retenção: delphinidina-3-O-glicosídeo (23,86 min); malvidina-3,5-O-glicosídeo (26,66 min); cianidina-3-O-glicosídeo (28,46 min); pelargonidina-3-O-glicosídeo (29,85 min); peonidina-3-O-glicosídeo (33,32 min); e malvidina-3-O-glicosídeo (36,30 min); e em concentrações distintas (Tabela 2).

**Tabela 2 Perfil quantitativo de antocianinas majoritárias presentes em resíduo agroindustrial de suco de uva cv. Isabel**

Antocianinas	Teores	
	(mg. g <sup>-1</sup> amostra)	(%)
Cianidina-3-O- glicosídeo	2,97±0,061	3,99
Cianidina-3,5-O- diglicosídeo	ND	-
Delfinidina-3-O- glicosídeo	2,88±0,000	3,87
Malvidina-3-O- glicosídeo	45,87±0,092	61,66
Malvidina-3,5-O- diglicosídeo	11,07±0,083	14,88
Pelargonidina-3-O- glicosídeo	7,04±0,040	9,46
Peonidina-3-O- glicosídeo	4,57±0,023	6,14

ND: não detectado. Os valores referem-se à média de três determinações ± desvio padrão.

Evidencia-se na Tabela 2 a predominância da malvidina-3-O-glicosídeo e da malvidina-3,5-O-diglicosídeo, sendo a primeira em maior proporção (45,87 mg. g<sup>-1</sup> amostra), contribuindo com 61,66% da composição total das antocianinas identificadas, enquanto que a cianidina-3-O-glicosídeo (3,99%) e delphinidina-3-O-glicosídeo (3,87%) encontravam-se em menor concentração. Cabe ressaltar que o grau de hidroxilação e metoxilação implica decisivamente na estabilidade das antocianinas. Quanto maior a ocorrência de grupos metoxilas mais estabilidade é

conferida à molécula, o inverso ocorre na presença de grupos hidroxilas (FRANCIS, 1989), podendo esta característica influenciar o desempenho das propriedades antioxidantes.

Este resultado corrobora os encontrados por outros autores que relataram ser a malvidina-3-O-glicosídeo a antocianina mais abundante em uvas (KALLITHRAKA *et al.*, 2005), sucos de uva (TENORE *et al.*, 2012) e resíduos de vinho (KY *et al.*, 2014), todos da espécie *Vitis vinifera*. Perfil antociânico em proporções semelhantes ao obtido foi exposto por Natividade *et al.* (2013) em suco de uva cv. Isabel (*Vitis labrusca*). Diferenças qualitativa e quantitativa foram constatadas pelos mesmos autores em sucos de uva de igual e de outras espécies cultivadas na região do Vale do São Francisco, enfatizando a importância da cultivar e a influência de seus fatores intrínsecos. Em resíduo de suco de uva da cultivar Kyoho (*Vitis labrusca*), Li *et al.* (2013) destacaram a malvidina 3-(trans)-coumaroil-5-diglicosídeo como componente majoritário. Em relação às antocianinas não aciladas identificadas por esses autores, a malvidina-3-O-glicosídeo foi do mesmo modo a mais abundante, seguida, igualmente, da malvidina-3,5-O-diglicosídeo, enquanto que a cianidina-3-O-glicosídeo encontrava-se, também, em menor concentração.

Outros compostos não identificados foram observados no cromatograma obtido, através de picos posteriores, nos tempos de retenção entre 40 e 50 minutos, presumindo-se a presença de antocianinas aciladas, uma vez que estas são eluídas em tempos de retenção maiores segundo Drust e Wrolstad (2001). Geralmente, a presença de um grupo acil na molécula está relacionada ao aumento da ação antioxidante. Em seu estudo, Azevedo *et al.* (2011) demonstraram que a acilação da malvidina-3-O-glicosídeo com ácidos fenólicos, tais como ácidos caféico ou cumárico, amplia o desempenho destas propriedades. No entanto, algumas pesquisas indicam que as antocianinas não aciladas têm maior biodisponibilidade do que as antocianinas aciladas (KURILICH *et al.*, 2005; CHARRON *et al.*, 2007).

A glicosilação no C-3, com mono ou dissacarídeos, pode reduzir a atividade antioxidante, se comparada à sua correspondente aglicona (LIMA; GUERRA, 2003). Ainda que o oposto também possa ocorrer em casos específicos, a exemplo da malvidina e malvidina-3-O-glicosídeo, tendo esta última, maior eficácia que a sua aglicona em experimento com vinho tinto (LAPIDOT *et al.*,

1999). Além da malvidina-3-O-glicosídeo e malvidina-3,5-O-diglicosídeo, a presença das outras moléculas de antocianinas identificadas em menor proporção, bem como a provável existência de antocianinas aciladas, pode exercer importante efeito na capacidade antioxidante do resíduo de uva analisado, uma vez que estes compostos poderão agir como sinergistas intramoleculares.

#### Avaliação da capacidade antioxidante

##### *Capacidade de sequestrar o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>)*

O comportamento cinético e antirradical das antocianinas do resíduo agroindustrial de suco de uva cv. Isabel, tendo como padrão o ácido gálico, encontra-se na Tabela 2, na qual é possível observar valores de EC<sub>50</sub>, T<sub>EC50</sub> e EA estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre as antocianinas e o ácido gálico.

**Tabela 3 - Valores de EC<sub>50</sub>, T<sub>EC50</sub>, classificação cinética e antirradical de antocianinas do resíduo agroindustrial de suco de uva cv. Isabel, e do ácido gálico.**

Ensaio	DPPH <sup>•</sup>				
	EC <sub>50</sub> (g amostra. g DPPH <sup>•</sup> <sup>-1</sup> )	T <sub>EC50</sub> (minutos)	Classificação cinética	EA	Classificação antirradical
ACY	0,26±0,020*	1,37±0,035*	Rápido	2,81±0,229*	Média
Ácido gálico	0,14±0,001	0,54±0,005	Rápido	13,23±0,172	Super alta

ACY: antocianinas; EC<sub>50</sub>: concentração eficiente para diminuir em 50% a concentração inicial de DPPH<sup>•</sup>; T<sub>EC50</sub>: tempo necessário para atingir o valor de EC<sub>50</sub>; EA: eficiência antirradical (1/EC<sub>50</sub>.T<sub>EC50</sub>). Os valores referem-se à média de três determinações ± desvio padrão. (\*) Valores diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t de Student.

Convém ressaltar que o primeiro valor é inversamente relacionado à atividade antirradical, ou seja, as amostras com baixo valor de EC<sub>50</sub> possuem um

elevado potencial de sequestro de radicais livres. Logo, as antocianinas do resíduo de uva ( $EC_{50}$ : 0,26 g. g DPPH<sup>-1</sup>, valor correspondente a 9,13  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ) apresentaram ação de sequestro do radical DPPH<sup>\*</sup> inferior ao ácido gálico ( $EC_{50}$ : 0,14 g. g DPPH<sup>-1</sup>, valor correspondente a 5,27  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ). Não obstante a existência de variações estatísticas, ambas as amostras exibiram alta capacidade de sequestro de acordo com o parâmetro avaliado. Este resultado é ratificado por Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1999), os quais referem ao ácido gálico o mais baixo valor de  $E_{C50}$  em relação aos extratos de produtos vinícolas (vinhos e sucos de uva) bem como aos demais padrões (ácido caféico, ácido ferúlico, ácido tânico, BHA, quercetina, resveratrol, rutina e vitamina E) testados. Outros autores também evidenciaram a superioridade do ácido gálico frente ao radical livre DPPH<sup>\*</sup> considerando o valor de  $EC_{50}$  (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012).

Por este mesmo método, Ruberto *et al.* (2007) relataram para extratos metanólicos acidificados de bagaços de uva (*Vitis vinifera*) elevado potencial antioxidante ao analisarem o valor de  $EC_{50}$  das seguintes variedades: Nero d'Avola (38,93  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ), Cabernet Sauvignon (30,20  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ), Nerello Cappuccio (23,99  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ), Frappato (15,90  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ) e Nerello Mascalese (14,45  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ), demonstrando que os achados do presente estudo são superiores aos descritos acima. Expressiva ação de sequestro do radical DPPH<sup>\*</sup> também foi constatada em pesquisas semelhantes envolvendo extratos de resíduos de uva distintos (DE BEER *et al.*, 2003; LLOBERA; CAÑELLAS, 2007; ROCKENBACH *et al.*, 2011a; MAKRIS; KEFALAS, 2013; GENGAIHI *et al.*, 2014). Campos *et al.* (2008) utilizando diversas técnicas de extração (clássica, em e com fluido supercrítico ou SFE) e solventes orgânicos (etanol, n-hexano, diclorometano, butanol e acetato de etila) observaram oscilações no valor de  $EC_{50}$  (entre 13 e > 250  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ) para certas concentrações de extratos de bagaço de uva Cabernet Sauvignon.

O uso de diferentes solventes e procedimentos de extração afetam a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio e, conseqüentemente, a avaliação da capacidade de sequestro de radicais livres (ROCKENBACH *et al.*, 2008). Destaca-se ainda a importância do método empregado e a polaridade do meio reacional (MELO *et al.*, 2011). Por este motivo, a natureza da matéria-prima é significativa, pois interfere diretamente na composição dos extratos. O extrato bruto, abordado na análise comparativa referenciada, contém além de

antocianinas, outras substâncias, tais como açúcares, ácidos orgânicos e outros compostos fenólicos, as quais podem exercer influência expressiva sobre a determinação da atividade antioxidante (LIMA *et al.*, 2011). De modo geral, esta ação está relacionada ao efeito sinérgico exercido pelos constituintes do extrato, e não exclusivamente a um componente isolado. Embora alguns compostos possam contribuir mais do que outros (BABBAR *et al.*, 2011; ROCKENBACH *et al.*, 2011b; ARAÚJO *et al.*, 2014; KY *et al.*, 2014).

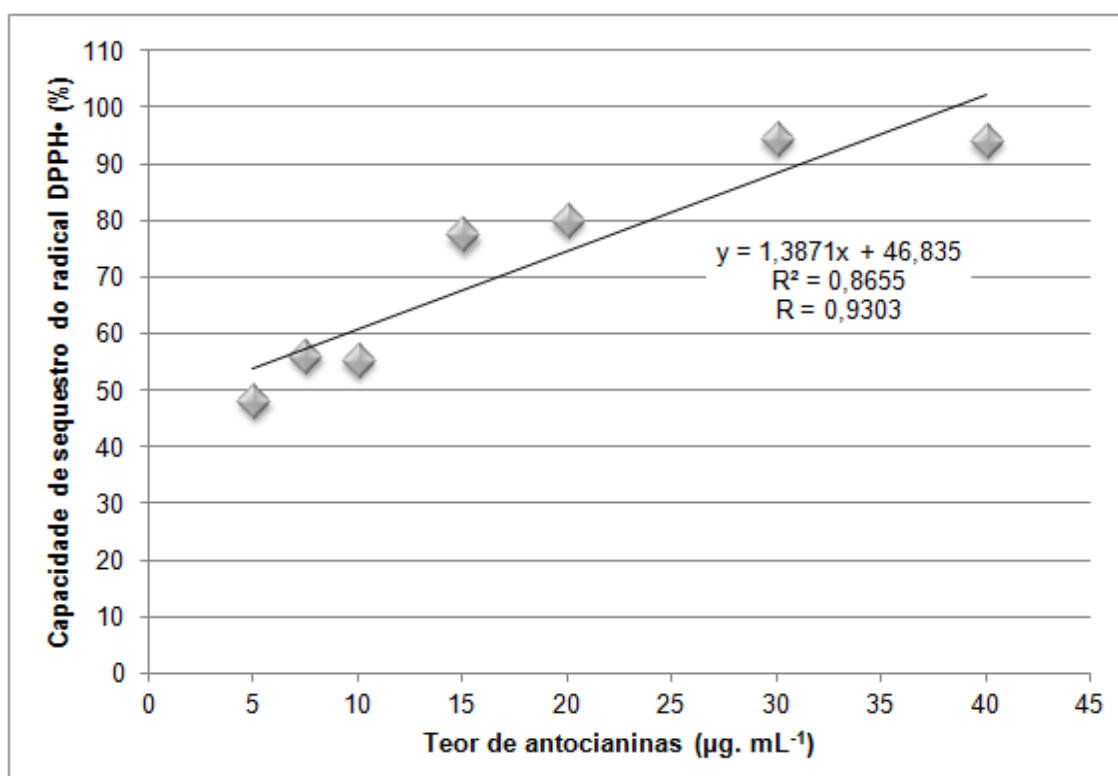
Em vinho tinto, frações isoladas como ácidos fenólicos, antocianinas e outros flavonoides apresentaram mais baixos valores de  $EC_{50}$  quando comparadas aos extratos fenólicos de cascas liofilizadas de uva (*Vitis vinifera*, variedades: Graciano, Cabernet Sauvignon e Tempranillo) em estudo realizado por Bartolomé *et al.* (2004). Segundo Gaulejac, Glories e Vivas (1999) frações antociânicas exibiram melhor capacidade de sequestrar o radical superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) em relação às demais frações fenólicas (taninos, procianidinas e catequinas) em vinho tinto. Antocianinas de flores de romã (pelargonidina 3,5-diglicosídeo: 23,62  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  e pelargonidina 3-glicosídeo: 19,56  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ) demonstraram atividade antioxidante equivalente ou superior aos extratos brutos (26,23  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ) dessa mesma fonte vegetal, considerando o valor de  $EC_{50}$  (ZHANG; FU; ZHANG, 2011). Esta tendência sugere que o potencial das substâncias antioxidantes, independente de isoladas ou não, seja condicionado à sua estrutura química, entre outros fatores já mencionados. Em geral, quanto maior o número de grupos hidroxila, menores são os valores de  $EC_{50}$  (LIMA; SUSSUCHI; GEOVANI, 2007).

Moreira *et al.* (2012) enfatizam que o poder antioxidante é resultante da capacidade do composto ou do extrato em atuar rapidamente, em baixa concentração, prevenindo ou retardando a reação de autooxidação. Portanto, para melhor avaliar a capacidade antioxidante de uma amostra se faz necessário utilizar outros parâmetros, além do  $EC_{50}$ . Em vista disso, Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998), estabeleceram o  $T_{EC_{50}}$  e EA como parâmetros de avaliação da capacidade antioxidante em ensaio de DPPH $\cdot$ . De acordo com a classificação cinética estabelecida, as antocianinas do resíduo agroindustrial de suco de uva e ácido gálico são igualmente rápidos ( $T_{EC_{50}} < 5$  minutos) na ação de sequestro do DPPH $\cdot$ , propriedade relevante na avaliação de um antioxidante. Por outro lado, a eficácia antirradical das antocianinas ( $EA > 1$  e  $\leq 5$ ; média) foi inferior ao ácido gálico ( $EA > 10$ ; super alta). Extratos diversos (hidroetanólico;

hidrometanólico; hidroacetônico) obtidos a partir do resíduo agroindustrial de acerola revelaram, respectivamente, os seguintes valores de  $T_{EC50}$  (0,80; 5,42; 8,57) e EA (5,68; 0,80; 0,35) (CAETANO *et al.*, 2011). Essa variação possibilitou que os extratos atingissem classificação cinética e antirradical similar e inferior à exibida pelas antocianinas avaliadas neste estudo.

Em diferentes concentrações (5 a 40  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ), as antocianinas do resíduo agroindustrial de suco de uva cv. Isabel, aos 5 minutos de reação, apresentaram percentual de sequestro do radical DPPH $\cdot$  de 48 a 94%, respectivamente, evidenciando ser a ação antioxidante dependente da concentração empregada no ensaio (Figura 1)

**Figura 1 - Correlação entre a capacidade de sequestro do radical DPPH $\cdot$  (aos 5 minutos de reação) e o teor de antocianinas do resíduo agroindustrial de suco de uva cv. Isabel.**



Observa-se na Figura 1 que o coeficiente de correlação ( $R = 0,93$ ) indica uma relação forte e direta entre o percentual de sequestro de radical livre DPPH $\cdot$  e o teor de antocianinas. O mesmo coeficiente de correlação entre a concentração de antocianinas e capacidade de sequestro do radical DPPH $\cdot$  foi reportada por Abe *et al.* (2007) em uvas das espécies *Vitis labrusca* e *Vitis vinifera*. Este

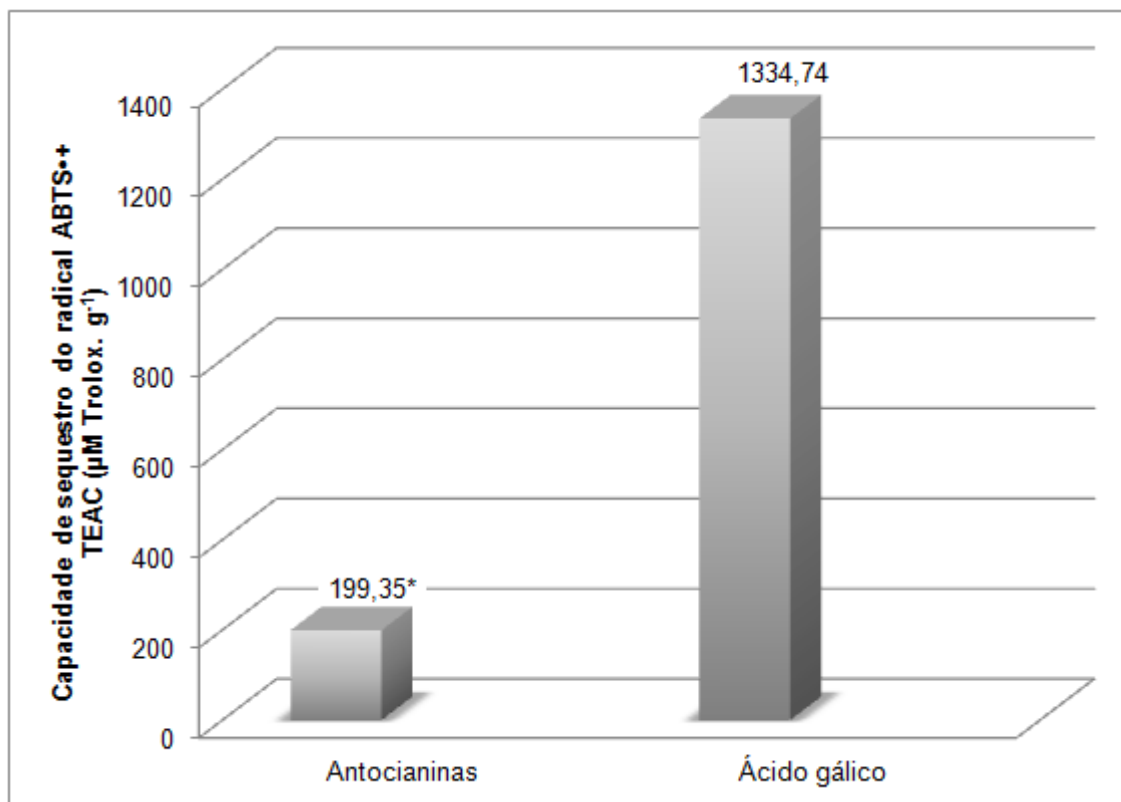
resultado ratifica os obtidos por vários autores em estudos com uva e derivados, e outras fontes vegetais (ESPÍN *et al.*, 2000; MUÑOZ-ESPADA *et al.*, 2004; JIAO *et al.*, 2012; CUI *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2014). Contudo, Kallithraka *et al.* (2005) e Vedana *et al.* (2008) não encontraram correlação estatisticamente significativa entre as variáveis supracitadas em cultivares de *V. labrusca* e *V. vinifera*, respectivamente, corroborando para a influência de outros constituintes do fruto.

#### *Capacidade de sequestrar o radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácidosulfônico) (ABTS<sup>•+</sup>)*

A capacidade de sequestro do radical ABTS<sup>•+</sup>, em equivalente de Trolox (TEAC), é diretamente relacionada à ação antirradical. Portanto, ao analisar o gráfico da Figura 2, evidencia-se que a atividade antioxidante, após os 6 minutos de reação, das antocianinas do resíduo agroindustrial de suco de uva cv. Isabel (199,35  $\mu\text{M Trolox. g}^{-1}$ ) diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) do padrão ácido gálico (1334,74  $\mu\text{M Trolox. g}^{-1}$ ), sendo este último mais eficiente que as amostras avaliadas. Do ponto de vista químico, a presença de três grupos hidroxila (OH) na molécula do ácido gálico é um fator determinante para potencializar a sua atividade (SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1999). Quanto às antocianinas, além do maior número de grupos hidroxila, a posição deste grupamento na molécula também é de importância primária para o desempenho de propriedades antioxidantes. A estrutura o-diidroxila presente no anel B, é uma característica essencial para a atividade antioxidante das antocianinas (LIMA; GUERRA, 2003).

Estudo conduzido por Rockenbach *et al.* (2011a) revelou diferenças na ação radical ABTS<sup>•+</sup>, expressa em TEAC ( $\mu\text{M Trolox. g}^{-1}$ ), entre extratos metanólicos acidificados de bagaços de uva liofilizados das seguintes variedades: Cabernet Sauvignon (485,42); Merlot (318,16); Bordeaux (355,06); e Isabel (193,36), constatando-se semelhanças entre os resultados desta última e das antocianinas deste estudo, extraídas e purificadas de resíduo de uva da mesma cultivar, apesar das distinções quanto à origem e ao processamento. Isto sugere que as antocianinas contribuem substancialmente para a capacidade de sequestro do radical ABTS<sup>•+</sup> em subprodutos vinícolas.

Figura 2 - Capacidade de sequestro do radical ABTS<sup>•+</sup> das antocianinas do resíduo agroindustrial de suco de uva cv. Isabel e do ácido gálico.



TEAC: atividade antioxidante em equivalente de Trolox (6 minutos). Os valores referem-se à média de três determinações. (\*) Valores diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t de Student.

Alto potencial antioxidante foi igualmente evidenciado em outras pesquisas com resíduos de uva variados, empregando o mesmo método de avaliação (RUBERTO *et al.*, 2007; CATANEO *et al.*, 2008; ROCKENBACH *et al.*, 2008; MELO *et al.*, 2011; KY *et al.*, 2014). Diversos resíduos agroindustriais também têm mostrado ação antioxidante baseada na captura dos radicais livres orgânicos sintéticos DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>, a exemplo dos subprodutos de frutas como cassis ou groselha-preta (KAPASAKALIDIS; RASTALL; GORDON, 2006; SÓJKA *et al.*, 2009), sabugueiro (SEABRA *et al.*, 2010), goiaba (NASCIMENTO; ARAÚJO, MELO, 2010; MELO *et al.*, 2011), acerola (CAETANO *et al.*, 2011), amora (ZHANG *et al.*, 2011), resíduos de polpas de abacaxi, bacuri, cupuaçu, graviola (SOUSA; VIEIRA; LIMA, 2011), sementes de uva e lichia, tal como cascas de banana, tangerina (kinnow) (BABBAR *et al.*, 2011), jabuticaba (ARAÚJO *et al.*,



2013), manga (ARAÚJO *et al.*, 2014) e bagaço de morango (ŠAPONJAC *et al.*, 2015).

Comparando-se os resultados (Tabelas 2 e 3 e Figuras 1 e 2), constata-se que as antocianinas do resíduo avaliado, contendo a malvidina-3-O-glicosídeo e a malvidina-3,5-O-glicosídeo como os principais componentes majoritários, demonstrou relevante potencial antioxidante por ambos os métodos empregados. Estas metodologias não envolvem condições drásticas de temperatura, oxigenação e luz, fatores considerados críticos para a estabilidade das antocianinas e, provavelmente, para a ação antioxidante, considerando a sua relação com o teor de antocianinas.

## **CONCLUSÃO**

O resíduo agroindustrial de suco de uva cv. Isabel constitui uma fonte significativa para a obtenção de antocianinas. A fração antociânica, extraída e purificada deste material residual, exibiu considerável atividade antirradical, atuando na captura dos radicais livres DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>, de forma dose-dependente. Possivelmente, esta ação antioxidante relaciona-se à presença das antocianinas majoritárias identificadas bem como ao efeito sinérgico destes compostos. Nesse sentido, apresenta-se como uma opção para o reaproveitamento de subprodutos vitícolas, sendo uma alternativa de antioxidante natural com potencial aplicação na indústria de alimentos.

## REFERÊNCIAS

ABBASI, A. M.; SHAH, M. H.; LIU, R. H.; GUO, X. Ethnomedicinal values, phenolic contents and antioxidant properties of wild culinary vegetables. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 5 (Available online), 2015.

ABE, L. T.; DA MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 394-400, 2007

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, v. 350, n. 1, p. 103-108, 2000.

ANDERSON, R. F.; AMARASINGHE, C.; FISHER, L. J.; MAK, W. B.; PACKER, J. E. Reduction in free-radical-induced DNA strand breaks and base damage through fast chemical repair by flavonoids. **Free Radical Research**, v. 33, n. 1, p. 91-103, 2000.

ARAÚJO, C. R.; BOTELHO, P. S.; SILVA, T. M. S.; MACIEL, M. I. S.; MELO, E. A.; RYAND, S.; SMITHD, R. E. Phenolic compounds and metals in tommy atkins mango (*Mangifera indica* L) peels. **The Natural Products Journal**, v. 4, n. 1, p. 2-7, 2014.

ARAÚJO, C. R. R.; SILVA, T. M.; LOPES, M.; VILLELA, P.; ALCÂNTARA, A. F. C.; DESSIMONI-PINTO, N. A. V. Total antioxidant capacity, total phenolic content and mineral elements in the fruit peel of *Myrciaria cauliflora*. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 4, p. 301-309, 2013.

AZEVEDO, J.; TEIXEIRA, N.; OLIVEIRA, J.; FREITAS, V.; MATEUS, N. Effect of sugar acylation on the antioxidant properties of *Vitis vinifera* red grape malvidin-3-glucoside. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 2, p. 343-349, 2011.

BABBAR, N.; OBEROI, H. S.; UPPAL, D. S.; PATIL, R. T. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues.

**Food Research International**, v. 44, p. 391-396, 2011.

BARTOLOMÉ, B.; NUÑEZ, V.; MONAGAS, M.; GÓMEZ-CORDOVÉS. In vitro antioxidant activity of red grape skins. **European Food Research and Technology**, v. 218, p. 173-177, 2004.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 01, de 7 de janeiro de 2000. Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de e suco de frutas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 jan. 2000.

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

CAETANO, A. C. S.; ARAÚJO, C. R.; LIMA, V. L. A. G.; MACIEL, M. I. S.; MELO, E. A. Evaluation of antioxidant activity of agro-industrial waste of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) fruit extracts. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 3, p. 769-775, 2011.

CATANEO, C. B.; CALIARI, V.; GONZAGA, L. V.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 93-102, 2008.

CAMPOS, L. M. A. S.; LEIMANN, F. V.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8413-8420, 2008.

CARVALHO, P. G. B.; MACHADO, C. M. M.; MORETTI, C. L.; FONSECA, M. E. N. Hortaliças como alimentos funcionais. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 4, 2006.

CHARRON, C. S.; CLEVIDENCE, B. A.; BRITZ, S. J.; NOVOTNY, J. A. Effect of dose size on bioavailability of acylated and nonacylated anthocyanins from red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5354-5362, 2007.

CLEMENTE, E.; GALLI, D. Stability of the anthocyanins extracted from residues of the wine industry. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 3, p. 765-768, 2011.

CUI, C.; ZHANG, S.; YOU, L.; REN, J.; LUO, W.; CHEN, W.; ZHAO, M. Antioxidant capacity of anthocyanins from *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) and identification of the major anthocyanins. **Food Chemistry**, v. 139, p. 1-8, 2013.

DE BEER, D.; JOUBERT, E.; GELDERBLOM, W. C. A.; MANLEY, M. Antioxidant activity of south african red and white cultivar wines: free radical scavenging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 902-909, 2003.

DRUST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Separation and characterization of anthocyanins by HPLC. In: WROLSTAD, R. E. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001. p. F1.3.1-F1.3.1.3.

ESPÍN, J. C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H. J.; GARCÍA-VIGUERA, C. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1588-1592, 2000.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

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

GARCÍA-LOMILLO, J.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L.; PINO-GARCÍA, R.; RIVERO-PÉREZ, M. D.; MUÑIZ-RODRÍGUEZ, P. Antioxidant and antimicrobial properties of wine byproducts and their potential uses in the food industry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 52, p. 12595-12602, 2014.

GAULEJAC, N. S.; GLORIES, Y.; VIVAS, N. Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines. **Food Research International**, v. 32, p. 327-333, 1999.

GENGAIHI, S. E.; ELLA, F. M. A.; EMAD, M. H.; SHALABY, E.; DOHA, H. Antioxidant activity of phenolic compounds from different grape wastes. **Food Processing & Technology**, v. 5, n. 2, p. 1-5, 2014.

GILGUN-SHERKI, Y.; ROSENBAUM, Z.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. **Pharmacological Reviews**, v. 54, n. 2, p. 271-284, 2002.

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

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **The lancet**, v. 344, p. 721-724, 1994.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 16, p. 33-50, 1996.

HARTMAN, P. E.; SHANKEL, D. M. Antimutagens and anticarcinogens: A survey of putative interceptor molecules. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 15, n. 3, p. 145-182, 1990.

JIAO, Y.; JIANG, Y.; ZHAI, W.; YANG, Z. Studies on antioxidant capacity of anthocyanin extract from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 27, p. 7046-7054, 2012.

JU, Z. Y.; HOWARD, L. R. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5207-5213, 2003.

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

KAPASAKALIDIS, P. G.; RASTALL, R. A.; GORDON, M. H. Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4016-4021, 2006.

KHANAL, R. C.; HOWARD, L. R.; PRIOR, R. L. Effect of heating on the stability of grape and blueberry pomace procyanidins and total anthocyanins. **Food Research International**, v. 43, n. 5, p. 1464-1469, 2010.

KIM, D.; JEONG, S. W.; LEE, C. Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, v. 81, n. 3, p. 321-326, 2003.

KURILICH, A. C.; CLEVIDENCE, B. A.; BRITZ, S. J.; SIMON, P. W.; NOVOTNY, J. A. Plasma and urine response are lower for acylated vs nonacylated anthocyanins from raw and cooked purple carrots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6537-6542, 2005.

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

LAPIDOT, T.; HAREL, S.; AKIRI, B.; GRANIT, R.; KANNER, J. pH-Dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 67-70, 1999.

LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the ph differential method: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 5, p. 1269-1278, 2005.

LEE, J.; RENNAKER, C.; WROLSTAD, R. E. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. **Food Chemistry**, v. 110, p. 782-786, 2008.

LI, Y.; MA, R.; XU, Z.; WANG, J.; CHEN, T.; CHEN, F.; WANG, Z. Identification and quantification of anthocyanins in Kyoho grape juice-making pomace, Cabernet Sauvignon grape winemaking pomace and their fresh skin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 6, p. 1404-1411, 2013.

LIMA, V. L. A. G.; GUERRA, N. B. Antocianinas: atividade antioxidante e biodisponibilidade. **Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 37, p. 121-128, 2003.

LIMA, A. A.; SUSSUCHI, E. M.; GIOVANI, W. F. Electrochemical and antioxidant properties of anthocyanins and anthocyanidins. **Croatica Chemica Acta**, v. 80, n. 1, p. 29-34, 2007.

LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A.; PINHEIRO, I. O.; GUERRA, N. B. Antioxidant capacity of anthocyanins from acerola genotypes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 86-92, 2011.

LIMA, M. S.; SILANI, I. S. V.; TOALDO, I. M.; CORRÊA, L. C.; BIASOTO, A. C. T.; PEREIRA, G. E.; BORDIGNON-LUIZ, M.; 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.

LIONETTO, M. G.; GIORDANO, M. E.; CALISI, A.; ERROI, E.; DE NUCCIO, F.; SCHETTINO, T. Effect of the daily ingestion of a purified anthocyanin extract from grape skin on rat serum antioxidant capacity. **Physiological Research**, v. 60, p. 637-645, 2011.

LLOBERA, A.; CAÑELLAS. Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. **Food Chemistry**, v. 101, p. 659-666, 2007.

McANLIS, G. T.; McENENY, J.; PEARCE, J.; YOUNG, I. S. The effect of various dietary flavonoids on the susceptibility of low density lipoproteins to oxidation in vitro using both metallic and non-metallic oxidising agents. **Biochemical Society Transactions**, v. 25, n. 1, p. 142S, 1997.

MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Characterization of polyphenolic phytochemicals in red grape pomace. **International Journal of Waste Resources**, v. 3, n. 2, p. 1-4, 2013.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 659-664, 2005.

MAZZA, G. Anthocyanins in grape and grape products. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, v. 35, p. 341-371, 1995.

MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K. B.; TIVERON, A. P.; MASSARIOLI, A. P.; OLDONI, T. L. C.; ZANUS, M. C.; PEREIRA, G. E.; ALENCAR, S. M. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p. 1088-1093, 2011.



MELLO, L. M. R. Vitivinicultura brasileira: Panorama 2012. **Comunicado Técnico**, n. 137. 1. ed. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2013. 5p. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot137.pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2014.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, p. 231-237, 2004.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH<sup>•</sup> assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, p. 1036-1043, 2012.

MORAES; E. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

MOREIRA, A. C. C. G.; NASCIMENTO, J. D. M.; SILVA, R. C. O.; MACIEL, M. I. S.; MELO, E. A. Polyphenols in caja-umbuzeiro fruit: extraction process efficiency and antioxidant potential. **The Natural Products Journal**, v. 2, n. 2, p. 139-148, 2012.

MUÑOZ-ESPADA, A. C.; WOOD, K. V.; BORDELON, B.; WATKINS, B. A. Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of Concord, Norton, and Marechal Foch grapes and wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6779-6786, 2004.

NASCIMENTO, R. J.; ARAÚJO, C. R.; MELO, E. A. Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba (*Psidium guajava* L.). **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 2, p. 209-216, 2010.

NATIVIDADE, M. M. P.; CORRÊA, L. C.; SOUZA, S. V. C.; PEREIRA, G. E.; LIMA, L. C. O. Simultaneous analysis of 25 phenolic compounds in grape juice for

HPLC: method validation and characterization of São Francisco Valley samples. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 665-674, 2013.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, n. 3, p. 791-800, 2006.

PONTES, P. R. B.; SANTIAGO, S. S.; SZABO, T. N.; TOLEDO, L. P.; GOLLÜCKE, A. P. B. Atributos sensoriais e aceitação de sucos de uva comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 313-318, 2010.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RÍO SEGADE, S.; ROLLE, L.; GERBI, V.; ORRIOLS, I. Phenolic ripeness assessment of grape skin by texture analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 8, p. 644-649, 2008.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Analytical characteristics and discrimination of Brazilian commercial grape juice, nectar, and beverage. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 1, 2012.

ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 238-244, 2008.

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

RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; WROLSTAD, R. E. Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. In: WROLSTAD, R. E. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001. p. F1.1.1-F1.1.10.

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

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 270-276, 1998.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. **Food Research International**, v. 32, p. 407-412, 1999.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.

ŠAPONJAC, V. T.; GIRONÉS-VILAPLANA, A.; DJILAS, S.; MENA, P.; ĆETKOVIĆ, G.; MORENO, D. A.; ČANADANOVIĆ-BRUNET, J.; VULIĆ, J.; STAJČIĆA, S.; VINČIĆA, M. Chemical composition and potential bioactivity of strawberry pomace. **RSC Advances**, n. 5, 5397-5405, 2015.

SEABRA, I. J.; BRAGA, M. E. M.; BATISTA, M. T.; SOUSA, H. C. Effect of solvent (CO<sub>2</sub>/ethanol/H<sub>2</sub>O) on the fractionated enhanced solvent extraction of

anthocyanins from elderberry pomace. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, n. 2, p. 145-152, 2010.

SILVA, G. J. F.; CONSTANT, P. B. L.; FIGUEIREDO, R. W.; MOURA, S. M. Formulação e estabilidade de corantes de antocianinas extraídas das cascas de jabuticaba (*Myrciaria ssp.*). **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 3, p. 429-436, 2010.

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 59-64, 2008.

SÓJKA, M.; GUYOT, S.; KOŁODZIEJCZYK, K.; KRÓL, B.; BARON, A. Composition and properties of purified phenolics preparations obtained from an extract of industrial blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) pomace. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, ISAFRUIT Special Issue, p. 100-106, 2009.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. p. 202-210, 2011.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; SILVA, M. J. M.; LIMA, A. Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 3, p. 554-559, 2011.

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

SOUZA, V. B.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. C. ; FAVARO-TRINDADE. 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.

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**, v. 55, n. 4, p. 297-304, 2008.

TENORE, G. C.; MANFRA, M.; STIUSO, P.; COPPOLA, L.; RUSSO, M.;

MONTERREY, I. M. G.; CAMPIGLIA, P. Antioxidant profile and in vitro cardiac radical-scavenging versus pro-oxidant effects of commercial red grape juices (*Vitis vinifera* L.cv. Aglianico N.), **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60 p. 9680-9687, 2012.

VACCARI, N. F. S.; SOCCOL, M. C. H; IDE, G. M. Compostos fenólicos em vinhos e seus efeitos antioxidantes na prevenção de doenças. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 8, n. 1, p. 71-83, 2009.

VANINI, L. S.; HIRATA, T. A.; KWIATKOWSKI, A.; CLEMENTE, E. Extraction and stability of anthocyanins from the Benitaka grape cultivar (*Vitis vinifera* L.). **Brazilian Journal Food Technology**, v. 12, n. 3, p. 213-219, 2009.

VEDANA, M. I. S.; ZIEMER, C.; MIGUEL, O. G.; PORTELLA, A. C.; CANDIDO, L. M. B. Efeito do processamento na atividade antioxidante de uva. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 2, p. 159-165, 2008.

WHITE, B. L.; HOWARD, L. R.; PRIOR, R. L. Proximate and polyphenolic characterization of cranberry pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4030-4036, 2010.

ZHANG, L.; FU, Q.; ZHANG, Y. Composition of anthocyanins in pomegranate flowers and their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1444-1449, 2011.

ZHANG, W.; HE, J.; PAN, Q.; HAN, F.; DUAN, C. Separation and character analysis of anthocyanins from mulberry (*Morus alba* L.) pomace. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 29, n. 3, p. 268-276, 2011.

# **CAPÍTULO II**

---

---

## **ARTIGO II:**

ESTABILIDADE DE ANTOCIANINAS DO RESÍDUO  
AGROINDUSTRIAL DE SUCO DE UVA cv. ISABEL PRODUZIDA  
NO VALE DO SÃO FRANCISCO

## RESUMO

Diante da atual tendência em usar pigmentos naturais como corantes em alimentos, ênfase tem sido dada a busca de fontes economicamente viáveis, especialmente quando obtidas de materiais residuais com apelo sustentável. Em vista disso, este trabalho teve como propósito avaliar a estabilidade das antocianinas do resíduo agroindustrial de suco de uva cv. Isabel frente à luz e ao calor. As antocianinas foram purificadas por extração em fase sólida, utilizando cartuchos C<sub>18</sub> com metodologia apropriada para promover a remoção de açúcares, ácidos e compostos fenólicos não antociânicos. Para avaliar a estabilidade à luz, as antocianinas foram diluídas em uma solução de etanol 95%: HCl 1,5N; 85:15 v/v (pH = 1,0) e distribuídas em tubos de ensaio, expostos à luz e na ausência de luz, durante um período de 840 horas (35 dias) a temperatura de 21°C ± 1°C. O efeito da temperatura sobre a estabilidade das antocianinas foi monitorado utilizando tubos de ensaio contendo antocianinas diluídas em água, acidificada com HCl (pH = 1,0), e submetidos a temperaturas de 50°C, 70°C e 90°C, em banho termostatizado. Leituras de absorvância foram efetuadas na amostra recém-preparada (0 h) e após 1, 3, 5 e 7 horas de aquecimento. Os experimentos foram monitorados em espectrofotômetro, e os dados das leituras de absorvância, utilizados para o cálculo da constante de velocidade (k) e do tempo de meia-vida (t<sub>1/2</sub>) das antocianinas por meio de equações cinéticas de 1ª ordem. Os resultados obtidos evidenciaram que na ausência de luz, o tempo de meia vida (t<sub>1/2</sub>) dos pigmentos antociânicos foi de 3.320h (138 dias), e na presença de luz foi de 505h (21 dias), apresentando constantes de velocidade (k) de 2,09 x 10<sup>-4</sup> h<sup>-1</sup> e 1,37 x 10<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente, demonstrando que a presença de luz contribuiu significativamente para a instabilidade das antocianinas. No estudo de estabilidade ao calor, as constantes de velocidade (k) foram 1,84 x 10<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> (50°C); 7,82 x 10<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> (70°C); 1,99 x 10<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (90°C) e o tempo de meia-vida das amostras ocorreu após 3,5h a temperatura de 90°C, e ocorreria, após 8,9h e 37,7h, para as amostras submetidas, respectivamente, a 70°C e 50°C, constatando a maior instabilidade das antocianinas à altas temperaturas. Portanto, conclui-se que o tempo de meia-vida das antocianinas foi reduzido pela presença de luz e calor. O teor desses pigmentos manteve-se estável por até 3 horas quando submetidos à temperatura de 50°C, e foi inversamente proporcional à intensidade do aquecimento com destaque na temperatura de 90°C, confirmando o efeito deletério do calor sobre a estabilidade das antocianinas. O reduzido tempo de meia vida desses pigmentos submetidos ao calor confirma que o aquecimento é um fator muito mais drástico sobre a estabilidade das antocianinas do que sua exposição à luz. As antocianinas do resíduo agroindustrial de uva surgem como potencial fonte de corante natural para uso em produtos alimentícios, quando associado ao controle da luz e temperatura.

**Palavras-chave:** *Vitis labrusca*; Luz; Temperatura.

## ABSTRACT

Given the current trend of using natural pigments and dyes in food, emphasis has been given to the search for economically viable sources, especially when they can be obtained from waste materials with sustainable appeal. Thus, this study aimed to evaluate the stability of purified anthocyanins from the pomace of cv. Isabella grape juice, front of the light and the heat. Anthocyanins were purified by solid phase extraction using C<sub>18</sub> cartridges with appropriate method to remove sugars, acids, and non-anthocyanin phenolic compounds. Purified anthocyanins were diluted in ethanol solution 95%: HCl 1.5N; 85:15 v/v (pH = 1.0) to evaluate the light stability to light and distributed into test tubes, exposed and not exposed to light for a period of 840 hours (35 days) at 21°C ± 1°C. The effect of temperature on the stability of anthocyanins was monitored using test tubes containing purified anthocyanins diluted into water, acidified with HCl (pH = 1.0), and subjected to temperatures of 50°C, 70°C and 90°C in thermostatic bath. Absorbance readings were made in the control sample (0h), and after 1, 3, 5 and 7 hours of heating. The experiments were monitored by spectrophotometer readings, and the absorbance data used to calculate the rate constant (k) and half-life (t<sub>1/2</sub>) of anthocyanins through first-order kinetics equations. The results showed that in the absence of light, the half-life (t<sub>1/2</sub>) of the anthocyanin pigments was 3.320h (138 days) and in the presence of light was 505h (21 days), with the follows rate constants (k) 2.09 x 10<sup>-4</sup> h<sup>-1</sup> e 1.37 x 10<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>, respectively, showing that presence of light contributed significantly to the instability of anthocyanins. In the study of heat stability, the rate constants (k) were 1.84 x 10<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> (50°C); 7.82 x 10<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> (70°C); 1.99 x 10<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (90°C) and the half-life of the samples occurred after 3.5h at 90°C and would occur after 8.9h and 37.7h for the samples at 70°C and 50°C, respectively, indicating the higher instability of anthocyanins to high temperatures. Therefore, it is concluded that half-life of purified anthocyanins was reduced by the presence of light and heat. The content of these pigments was stable until 3 hours when at 50°C, and was inversely proportional to the intensity of heating especially in the 90°C temperature, confirming the deleterious effect of heat on the stability of anthocyanins. The half-life reduction of these pigments when subjected to the heat confirms that heating is more drastic on the stability of anthocyanins than the light exposure.

**Keywords:** *Vitis labrusca*; Light; Temperature.



## INTRODUÇÃO

Considerando que a aparência é um fator determinante para a escolha do produto, os corantes destacam-se entre as classes dos aditivos químicos por desempenharem função relevante para o aspecto sensorial do alimento, e, conseqüentemente, para a indústria alimentícia. São definidos como substâncias naturais ou artificiais adicionadas aos alimentos com a finalidade de conferir ou intensificar a sua coloração (BRASIL, 1997). Em contrapartida o emprego de corantes sintéticos aos alimentos exige cautela visto que diversos estudos apontam impactos negativos à saúde, demonstrando a ocorrência de várias reações adversas, a curto e longo prazo, em decorrência de seu consumo (STEFANI *et al.*, 2009; POLÔNIO; PERES, 2009; KOBYLEWSKI; JACOBSON, 2010; MPOUNTOUKAS *et al.*, 2010). Por este motivo, os pigmentos naturais vêm sendo amplamente utilizados em alimentos e bebidas por séculos e, ao lado dos corantes artificiais, continuam a fazer uma contribuição significativa para o processamento de alimentos (HENRY, 1992).

Os flavonoides, encontrados com frequência na natureza, particularmente em plantas, englobam uma classe importante de pigmentos naturais que têm atraído atenção especial em virtude de suas atividades biológicas e fisiológicas, tornando-se um tema fundamental para a nutrição e saúde. E, assim, os potenciais efeitos positivos associados à ingestão de vegetais são atribuídos à presença desses compostos (ES-SAFI; CHEYNIER; MOUTOUNET, 2002).

As antocianinas destacam-se entre os flavonoides, e estão presentes no vacúolo das células epidermais de frutas, hortaliças, flores, folhas e raízes, sendo responsáveis por atribuir-lhes diversas colorações entre as tonalidades de laranja, vermelha e azul (FRANCIS, 1989). Estruturalmente, assumem diferentes formas químicas e variam de cor em função do pH. Apesar de serem altamente instáveis na forma de aglicona (antocianidinas), enquanto estão nas plantas são resistentes à luz, ao pH e às condições oxidativas. Na dieta humana, os compostos antociânicos estão presentes em diversos alimentos, como algumas variedades de cereais, vegetais folhosos e raízes, todavia, são mais abundantes em frutas e derivados. Encontram-se principalmente na casca, com exceção de certos tipos de frutas vermelhas, as quais ocorrem também na polpa. O conteúdo desses

compostos nos alimentos é proporcional à intensidade de cor e aumenta conforme o fruto amadurece (CLIFFORD, 2000; MANACH *et al.*, 2004).

Em uvas tintas, o teor de antocianinas, normalmente, varia de 30 a 750 mg. 100g<sup>-1</sup> de fruta (MAZZA, 1995). Sucos artesanais e comerciais brasileiros contêm cerca de 30 a 470 mg de antocianinas. L<sup>-1</sup>, expresso em cianidina-3-glicosídeo. Fatores como variedade da uva, técnica de processamento, prática vitícola e região geográfica exercem influência significativa sobre a composição química desses produtos (LIMA *et al.*, 2014). O suco de uva vem sendo bastante apreciado pelo consumidor brasileiro pelos seus efeitos positivos à saúde, apontando uma tendência de aumento em sua ingestão (MAIA *et al.*, 2013). Em consequência disso, foram comercializados no Brasil cerca de 78,03 milhões de litros de suco de uva (92% do tipo integral) em 2013, observando-se um acréscimo de 101,46% em relação à média (38,73 milhões de litros) dos anos anteriores (2008 a 2012) (CONAB, 2013). Como efeito deste consumo, quantidade elevada de resíduos sólidos é produzida pela indústria vitivinícola. Em geral, não há infraestrutura adequada disponível para lidar com o volume de biomassa gerado. Sem aplicação comercial, os resíduos são descartados, sem nenhum tratamento, causando sérios problemas ambientais (MELO *et al.*, 2011).

Os pigmentos antociânicos são uma fonte promissora de corante natural, porém, a estabilidade é um fator limitante para o seu uso na indústria de alimentos. Pesquisas vêm sendo conduzidas com o intuito de minimizar a perda de cor, bem como avaliar os fatores envolvidos no processo de degradação de antocianinas obtidas de diversas fontes vegetais e de subprodutos gerados pelo seu processamento (DYRBY; WESTERGAARD; STAPELFELDT, 2001; LIMA; MÉLO; LIMA, 2005; GÓMEZ-PLAZA; MIÑANO; LÓPEZ-ROCA, 2006; PACHECO-PALENCIA; DUNCAN; TALCOTT, 2009; ARAMWIT; BANG; SRICHANA, 2010; KHANAL; HOWARD; PRIOR, 2010; SILVA *et al.*, 2010; VERBEYST *et al.*, 2010, 2011; CLEMENTE; GALLI, 2011; SARI *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2013).

Nesse contexto, os resíduos agroindustriais são uma fonte sustentável para a produção de corantes naturais que demanda pesquisas. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo verificar a estabilidade à luz e ao calor das antocianinas purificadas do resíduo agroindustrial de suco de uva cv. Isabel.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

#### *Amostras*

O resíduo de uva (*Vitis labrusca*, cv. Isabel) foi cedido por uma indústria produtora de suco de uva integral, situada na região do Vale do São Francisco, na cidade de Petrolina-PE (Latitude Sul 09° 21'; Longitude Oeste 40° 40'; Altitude de 360m). O suco foi obtido pelo processo de extração a quente sem prensagem do bagaço conforme descrito por Lima *et al.* (2014). As uvas, utilizadas para obtenção do suco e material residual, foram colhidas durante a safra do mês de outubro/2013. As amostras (5 kg), compostas por cascas e sementes, foram coletadas diretamente da linha de produção, acondicionadas em sacos de polietileno de baixa densidade, congeladas e transportadas, em caixas isotérmicas, até o Laboratório de Análises Físico-Químicas de Alimentos (LAFQA) do Departamento de Ciências Domésticas (DCD) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), onde foram imediatamente armazenadas sob congelamento ( $-18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), sendo descongeladas, conforme as quantidades necessárias para cada ensaio. Todos os procedimentos seguintes ocorreram em condições de reduzida luminosidade.

### Métodos

#### *Extração das antocianinas*

O resíduo de suco de uva foi extraído com acetona acidificada (0,01% HCl) e filtrado, subsequentemente, até a completa remoção das antocianinas. Os sobrenadantes resultantes foram submetidos à partição com dois volumes de clorofórmio e estocados a  $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  pelo período de uma noite, possibilitando a separação das fases apolar e polar. A fase aquosa foi centrifugada (6000rpm, 10 minutos,  $4^{\circ}\text{C}$ ), levada ao evaporador rotatório ( $38^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sob vácuo) para a remoção total da acetona residual, e o extrato aquoso obtido estocado a  $-18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  para as análises posteriores (RODRIGUEZ-SAONA; WROLSTAD, 2001).

### *Purificação das antocianinas*

Extratos antociânicos aquosos foram purificados por meio de extração em fase sólida (SPE, *solid phase extraction*), utilizando cartuchos de C<sub>18</sub> 600mg (Alltech Assoc., Inc., Illinois, USA) segundo metodologia descrita por Rodriguez-Saona e Wrolstad (2001) para a remoção de açúcares, ácidos e outros compostos fenólicos não antociânicos. O extrato metanólico resultante foi concentrado a vácuo, em rota-evaporador (38°C ± 2°C), até a aquisição de um resíduo seco ao qual foi adicionado éter dietílico com a finalidade de precipitar os pigmentos (ESPÍN *et al.*, 2000). As antocianinas em pó obtidas, foram armazenadas sob congelamento (-18°C ± 1°C) até o momento das determinações analíticas.

### *Estudo de estabilidade das antocianinas*

#### a) Estabilidade à luz

Antocianinas purificadas foram diluídas em solução de etanol a 95% (HCl 1,5N; 85:15 v/v; pH = 1,0) na concentração de 0,1 mg. mL<sup>-1</sup>, e distribuídas em 12 tubos de ensaio (20 mL) rosqueados, cobertos com papel alumínio, mantidos a 21°C ± 1°C. Seis tubos foram expostos à luz fluorescente (80W) à distância de 1,45m, e os outros seis tubos foram mantidos ao abrigo da luz, cobertos cuidadosamente com tecido *blackout* (100% polipropileno). As leituras de absorvância foram realizadas a 535nm (LEES; FRANCIS, 1972), periodicamente, durante 840 horas (35 dias), sendo os dados obtidos utilizados para o cálculo da constante de velocidade (k) e do tempo de meia-vida (t<sub>1/2</sub>) das antocianinas por meio das seguintes equações cinéticas:

$$-\ln \left( \frac{\text{Absorvância (t)}}{\text{Absorvância (t}_0\text{)}} \right) = kt \quad (\text{Equação 1})$$

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

Onde: Absorvância (t) = absorvância em relação ao tempo; Absorvância (t<sub>0</sub>) = absorvância no tempo 'zero'; t = tempo (em horas); k = constante de velocidade; t<sub>1/2</sub> = tempo de meia vida.

## b) Estabilidade ao calor

O efeito da temperatura sobre a estabilidade das antocianinas purificadas foi monitorado utilizando 15 tubos de ensaio rosqueados, cobertos com papel alumínio, contendo 15 mL de antocianinas em solução aquosa acidificada com HCl (pH 1,0), preparadas numa concentração de 0,1 mg. mL<sup>-1</sup>, e que foram submetidas ao aquecimento a 50°C, 70°C e 90°C, em banho termostatizado com circulação de água, durante os períodos de 1, 3, 5 e 7 horas. As leituras de absorbância foram efetuadas na amostra recém-preparada (0h), a temperatura ambiente (22°C ± 2°C; controle), e após cada período de aquecimento. Passados os intervalos de tempo pré-determinados, as amostras foram removidas do banho termostatizado e resfriadas em banho de gelo até atingir a temperatura ambiente.

A solução aquosa de antocianinas foi apropriadamente diluída em tampões com pH 1,0 (cloreto de potássio, 0,025M) e pH 4,5 (acetato de potássio, 0,4M). Após 15 minutos de repouso, as absorbâncias foram mensuradas em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650PC) a 520 nm e 700 nm, calculadas de acordo com a equação descrita abaixo, e os valores de absorbância obtidos, utilizados para o estudo da cinética, conforme explicitado anteriormente (item a). O teor de antocianinas foi determinado segundo o método de pH diferencial (LEE; DURST; WROLSTAD, 2005), considerando a absortividade molar ( $\epsilon$ ) de 28.000 L. cm<sup>-1</sup>. mol<sup>-1</sup> e o peso molecular de 493,2 g. mol<sup>-1</sup> da malvidina-3-glicosídeo, e os resultados foram expressos em mg. L<sup>-1</sup>, aplicando a seguinte fórmula:

$$\text{Antocianinas monoméricas} = A \times \text{PM} \times \text{FD} \times 1000 / \epsilon \times 1$$

Onde:  $A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1,0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4,5}$ ; PM é o peso molecular; FD é o fator de diluição;  $\epsilon$  é a absortividade molar.

### *Tratamento estatístico dos dados*

O experimento foi instalado segundo delineamento experimental inteiramente ao acaso. Todas as determinações foram efetuadas em triplicata e os resultados submetidos ao teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ), utilizando o *software* "Statistica" (versão 7, StatSoft, Inc., Tulsa, USA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Estabilidade à luz

Na ausência de luz, a absorvância das antocianinas do resíduo agroindustrial de suco de uva cv. Isabel, em solução de etanol a 95% (pH 1,0), diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) até o tempo de 98h (4 dias), não apresentando, portanto, diferença estatisticamente significativa entre os intervalos de 98h (4 dias) a 432h (18 dias) e, depois, até o tempo final de 840h (35 dias), demonstrando estabilidade em ambas as condições. Por outro lado, as amostras submetidas à presença de luz diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) durante todo o período de estocagem a  $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , exceto nos dois últimos tempos (Tabela 1). Sendo assim, evidencia-se que as antocianinas testadas mantiveram-se mais estáveis ao abrigo da luz do que quando submetidas à luminosidade.

**Tabela 1 - Perda de absorvância de antocianinas\* do resíduo agroindustrial de suco de uva cv. Isabel, submetidas à presença e ausência de luz ( $T = 21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ).**

Tempo (horas)	Presença de luz		Ausência de luz	
	Abs.** (535 nm)	Perda (%)	Abs.** (535 nm)	Perda (%)
0	0,944±0,001 <sup>a</sup>	-	0,945±0,004 <sup>a</sup>	-
24	0,851±0,009 <sup>b</sup>	9,85	0,862±0,012 <sup>b</sup>	8,78
98	0,727±0,014 <sup>c</sup>	22,99	0,825±0,003 <sup>c</sup>	12,70
240	0,565±0,016 <sup>d</sup>	40,15	0,822±0,014 <sup>c</sup>	13,02
432	0,444±0,017 <sup>e</sup>	52,97	0,819±0,009 <sup>cd</sup>	13,33
576	0,378±0,018 <sup>f</sup>	59,96	0,811±0,008 <sup>d</sup>	14,18
720	0,326±0,022 <sup>g</sup>	65,47	0,795±0,019 <sup>d</sup>	15,87
840	0,298±0,015 <sup>g</sup>	68,43	0,793±0,020 <sup>d</sup>	16,08

(\*) Antocianinas em solução de etanol a 95% (HCl 1,5N; 85:15 v/v; pH = 1,0). (\*\*) Valores representam média de leituras de absorvância em seis tubos. Médias nas colunas seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

As constantes de velocidade (k) foram  $2,09 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$  e  $1,37 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$  para as antocianinas protegidas da luz e expostas à luz, respectivamente. Esses resultados revelaram que a velocidade de degradação das antocianinas protegidas da luz foi menor do que quando expostas à luz. A perda de 50% da absorbância inicial (tempo de meia-vida) ocorreu após 505h (21 dias) para as antocianinas submetidas ao efeito da luz e, aconteceria, portanto, após 3.320h (138 dias) para as amostras ao abrigo da luz, demonstrando a maior instabilidade das antocianinas à luminosidade.

Neste trabalho, o tempo de meia-vida das antocianinas purificadas expostas à luminosidade foi inferior ao dos extratos antociânicos bruto de pitanga roxa (948h; 39 dias) em estudo conduzido por Lima, Mélo e Lima (2005). A maior sensibilidade à luz das antocianinas purificadas quando comparadas a uma solução de extrato bruto, pode ser justificada pela não formação de complexos com outros constituintes do extrato (como por exemplo, os flavonoides), uma vez que os mesmos poderiam atuar como copigmentos, promovendo a estabilização da cor (CLIFFORD, 2000; MANACH *et al.*, 2004). Nas frações de antocianinas purificadas, outros flavonoides que naturalmente estariam presentes no extrato bruto são reduzidos, contribuindo para a suscetibilidade das antocianinas ao efeito da luminosidade, e assim, a decomposição é acentuada conforme o grau de purificação dos pigmentos (STRINGHETA; BOBBIO, 2000).

Por outro lado, no presente estudo, o tempo de meia-vida das antocianinas protegidas da luz (3.320h) foi superior ao tempo de meia-vida das antocianinas presentes no extrato bruto de pitanga roxa (1.205,7h; 50 dias) (LIMA, MÉLO; LIMA, 2005), demonstrando que a estabilidade desses pigmentos também é dependente de sua estrutura química. Segundo Mazza e Brouillard (1987) a presença de açúcares, açúcares acilados, de grupos metoxil e hidroxil têm um marcante efeito sobre a cor e reatividade das antocianinas. A presença de 4'-OH ou 7-OH na molécula estabiliza significativamente o pigmento enquanto que a metilação nessas posições tem efeito contrário. A glicosilação também afeta a estabilidade do pigmento. Em um dado pH, antocianinas 3-glicosídeos são mais coloridas do que 3,5 e 5-glicosídeos. Outro fator determinante na estabilidade das antocianinas à luz é a substituição no grupo hidroxílico do C-5 (conhecido pela sua fluorescência), pela sua maior decomposição fotoquímica em relação às moléculas não substituídas nessa posição (JACKMAN; SMITH, 1992).

Ao estudarem o efeito da luz, oxigênio e pH em extrato antociânico obtido das cascas do fruto de capulí (*Prunus serotina spp capuli* (Cav) Mc. Vaug Cav), Hurtado e Pérez (2014) reportaram diferentes tempos de meia-vida para as amostras em presença de luz e oxigênio em pH 3,0 (2.520h; 105 dias) e pH 5,0 (1.204,8h; 50,2 dias), bem como na ausência das mesmas variáveis, em pH 3,0 (8.755,2h; 364,8 dias) e pH 5,0 (3.326,4h; 138,6 dias), ratificando Francis (1989) ao apontar o pH como o principal fator interferente na cor das antocianinas, e Bobbio e Bobbio (1992) ao relatar a luz como o segundo fator que mais afeta a coloração desses pigmentos, intensificando-se ainda mais quando associada ao oxigênio. Sendo assim, do ponto de vista prático, as antocianinas possuem aplicação apenas em produtos ácidos (pH 4,0 ou menos), tendo em vista que o pH afeta tanto a tonalidade quanto à intensidade da coloração (HENRY, 1992).

Gómez-Plaza, Miñano e López-Roca (2006) ao avaliarem a estabilidade da cor de extratos aquosos antociânicos obtidos de resíduos de uva (*Vitis vinifera*) também constataram a sua instabilidade frente ao pH e à presença de luz, sendo, nesta última, observada uma redução acentuada da absorbância quando comparada às amostras que se mantiveram ao abrigo da luz. Este resultado corrobora com os dados da Tabela 1, que expõe a perda de absorbância das antocianinas do resíduo de uva cv. Isabel, a qual foi avaliada em 16,08%, na ausência de luz, e 68,43% na presença de luz. Redução similar (65,86%) no conteúdo de antocianinas foi determinada por Mayavel *et al.* (2012) em extrato metanólico acidificado de tamarindo vermelho na intensidade de 500lux, durante um período de armazenamento de 30 dias. Os autores também evidenciaram perda de cor do pigmento armazenado ao abrigo da luz (39,71%), na intensidade de 250lux (45,10%) e perda mais significativa durante exposição à luz solar direta (93,48%). A perda drástica observada na última condição pode ter ocorrido em razão do efeito combinado da alta intensidade de luz e temperatura, potencializando a degradação das moléculas de antocianina.



## Estabilidade ao calor

O processamento térmico é tido como um dos métodos de conservação mais importantes, sendo amplamente adotado pela indústria de alimentos para conferir segurança e qualidade aos alimentos. No entanto, este processo também é responsável por causar a degradação indesejável de compostos sensíveis ao calor (SUI; ZHOU, 2014). Assim, o mecanismo de degradação das antocianinas do resíduo agroindustrial de suco de uva cv. Isabel é dependente da temperatura conforme os parâmetros cinéticos exibidos na Tabela 2, na qual é possível verificar que os valores de absorvância das antocianinas diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) na medida em que houve o aumento da temperatura e o tempo de exposição.

**Tabela 2 - Parâmetros cinéticos de degradação térmica de antocianinas\* do resíduo agroindustrial de suco de uva cv. Isabel.**

Temperatura (°C)	Tempo (horas)	Abs.**	K (h <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (horas)
50	0	0,846±0,021 <sup>a</sup>	1,84 x 10 <sup>-2</sup>	37,66
	1	0,813±0,003 <sup>a</sup>		
	3	0,801±0,018 <sup>ab</sup>		
	5	0,753±0,039 <sup>b</sup>		
	7	0,744±0,013 <sup>b</sup>		
70	0	0,840±0,014 <sup>a</sup>	7,82 x 10 <sup>-2</sup>	8,86
	1	0,720±0,018 <sup>b</sup>		
	3	0,669±0,014 <sup>b</sup>		
	5	0,507±0,032 <sup>c</sup>		
	7	0,486±0,040 <sup>c</sup>		
90	0	0,837±0,039 <sup>a</sup>	1,99 x 10 <sup>-1</sup>	3,48
	1	0,663±0,009 <sup>b</sup>		
	3	0,327±0,042 <sup>c</sup>		
	5	0,237±0,039 <sup>cd</sup>		
	7	0,207±0,027 <sup>d</sup>		

Abs.: absorvância; K: constante de velocidade de degradação; t<sub>1/2</sub>: tempo de meia vida. (\*\*) Abs = (A<sub>520nm</sub> - A<sub>700nm</sub>)<sub>pH 1,0</sub> - (A<sub>520nm</sub> - A<sub>700</sub>)<sub>pH 4,5</sub>. (\*) Antocianinas em solução aquosa acidificada com HCl (pH = 1,0). Médias nas colunas, em cada temperatura, seguidas por letras iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

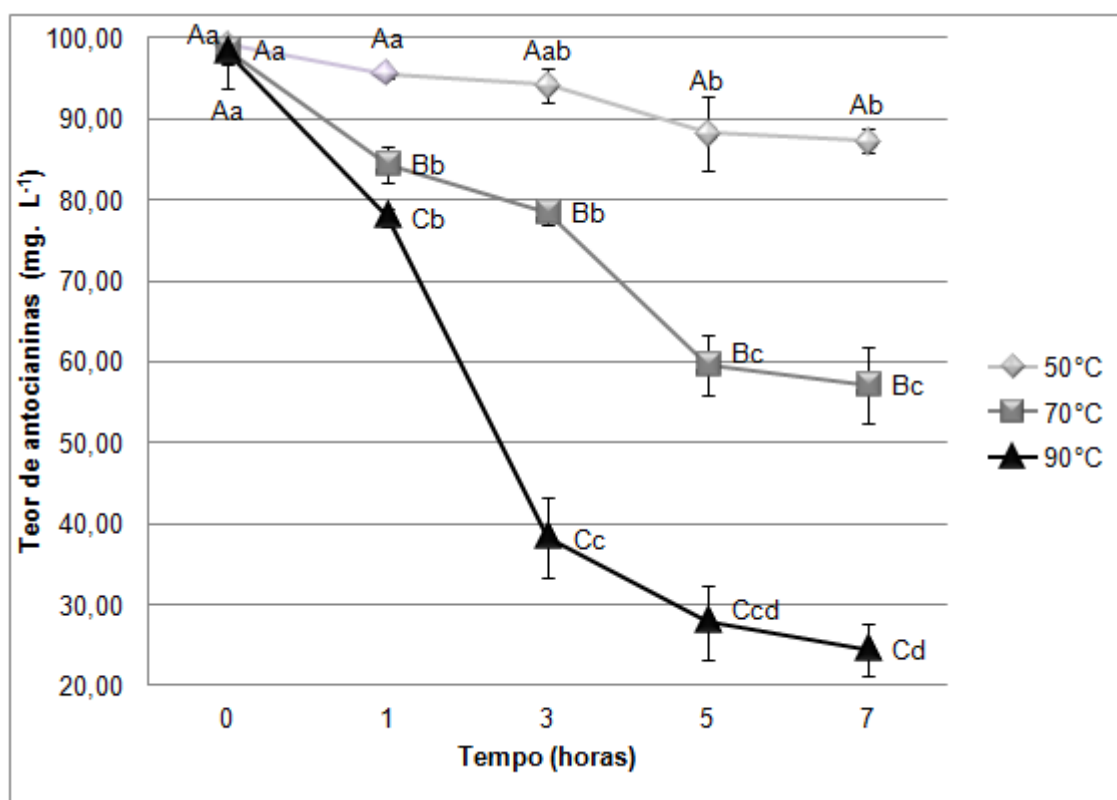
As constantes de velocidade (k) foram as seguintes:  $1,84 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  ( $50^{\circ}\text{C}$ );  $7,82 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  ( $70^{\circ}\text{C}$ );  $1,99 \times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $90^{\circ}\text{C}$ ); logo, o tempo de meia-vida das amostras ocorreu após 3,5h a temperatura de  $90^{\circ}\text{C}$ , e aconteceria, portanto, após 8,9h e 37,7h, para as amostras a  $70^{\circ}\text{C}$  e  $50^{\circ}\text{C}$ , evidenciando a maior instabilidade das antocianinas ao calor. Ao estudar condições similares, Sadilova, Stintzing e Carle (2006) obtiveram os seguintes tempos de meia-vida para antocianinas purificadas de: sabugueiro (1,9h), morango (3,2h), e cenoura preta (4,1h), durante aquecimento a  $95^{\circ}\text{C}$  (pH 1,0), diferenças explicadas em razão das variadas estruturas químicas das antocianinas, próprias de cada fonte vegetal. A degradação de antocianinas dos frutos de *Viburnum Opulus* foi avaliada por Moldovan *et al.* (2012) a temperatura de  $75^{\circ}\text{C}$ , em diferentes condições de pH. O tempo de meia-vida obtido para extratos aquosos em pH 3,0 foi de 15,03h e em pH 7,0 foi de 1,98h e enquanto que em extratos etanólicos em pH 3,0 foi de 12,86h e em pH 7,0 foi de 3,66h, corroborando a estabilidade das antocianinas ser atribuída à estrutura do íon flavilium presente nas soluções de pH abaixo de 3 (BOBBIO; BOBBIO, 2003).

Em revisão sobre o tema Malacrida e Motta (2006) sugerem a hidrólise glicosídica como o principal motivo da perda de cor no mecanismo de degradação térmica das antocianinas, considerando-se que a velocidade de liberação do açúcar é proporcional à velocidade da perda de cor vermelha. Por outro lado, a ocorrência de acilação na molécula promove a sua estabilização, e, conseqüentemente, a retenção de cor, ainda que em pH alcalino ou sob a ação de outros fatores como aquecimento e luz (BAKOWSKA-BARCZAK, 2005).

O gráfico ilustrado na Figura 1 indica que a degradação térmica do resíduo de uva analisado segue uma cinética de reação de primeira ordem. Segundo Kirca e Cemeroglu (2003), as antocianinas geralmente seguem esse comportamento cinético. A concentração de antocianinas do resíduo agroindustrial de suco de uva cv. Isabel, em solução aquosa acidificada (pH 1,0), durante o aquecimento, diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) entre as temperaturas testadas. Quando avaliados ao longo do tempo de aquecimento, o teor de antocianina no experimento a  $50^{\circ}\text{C}$  não apresentou, até 3 horas, diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), demonstrando estabilidade nessa condição. As amostras submetidas às temperaturas de  $70^{\circ}\text{C}$  e  $90^{\circ}\text{C}$  apresentaram comportamento semelhante,

diferindo significativamente do controle ( $p < 0,05$ ) a partir de 1 hora de aquecimento. Após esse tempo, observa-se uma redução drástica do teor de antocianinas em ambas as temperaturas ( $70^{\circ}\text{C}$  e  $90^{\circ}\text{C}$ ). Desta forma, é possível constatar o efeito deletério de altas temperaturas sob a estabilidade das antocianinas testadas.

**Figura 1 - Degradação térmica das antocianinas do resíduo agroindustrial de suco de uva cv. Isabel**



Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as temperaturas testadas e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa causada pelo aquecimento ao longo do tempo, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Wang, He e Li (2010) também relataram em seu estudo com mirtilo a instabilidade das antocianinas frente a temperaturas elevadas ( $\geq 80^{\circ}\text{C}$ ). Dyrby, Westergaard e Stapelfeldt (2001) compararam a estabilidade térmica (em pH 3,0) de quatro diferentes extratos comerciais e, para as temperaturas pesquisadas ( $25^{\circ}\text{C}$ ,  $40^{\circ}\text{C}$ ,  $60^{\circ}\text{C}$  e  $80^{\circ}\text{C}$ ) o grau de estabilidade foi maior em repolho roxo, seguido de resíduo de groselha, casca de uva e sabugueiro. Convém ressaltar que a estabilidade térmica desses pigmentos varia de acordo com a sua estrutura

química, pH, presença de oxigênio e interações com outros componentes do sistema (JACKMAN; SMITH, 1992). Estruturalmente, a degradação é prevenida pela glicosilação, geralmente com uma glicose na posição 3, e esterificação com diversos ácidos orgânicos (cítrico e málico) e ácidos fenólicos (CLIFFORD, 2000; MANACH *et al.*, 2004). Além disso, o grau de hidroxilação exerce importante efeito na estabilidade e coloração das antocianinas. A presença de mais grupos hidroxilas está relacionada com a instabilidade e, opostamente, o maior grau de metoxilação confere mais estabilidade à estrutura molecular (FRANCIS, 1989).

Estudo conduzido por Bordignon-Luiz *et al.* (2007), em sistema modelo alimentar, indicou que o extrato bruto de uva Isabel é relativamente estável em iogurte. Diversas condições foram testadas, sendo o maior tempo de meia-vida (1.514h) observado em condições de pH (3,0), temperatura ( $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), ao abrigo da luz, na presença de oxigênio e com a adição de ácido tânico, demonstrando ser possível aumentar a meia-vida das antocianinas por meio do controle dos vários fatores associados à degradação desses pigmentos. Jackman e Smith (1992) relatam que a utilização do tratamento térmico HTST (*High Temperature Short Time*) é mais adequada quando se trata de pigmentos antociânicos em alimentos, assim como, Lima, Mélo e Lima, (2005) que recomendam embalagens opacas para o armazenamento destes, a fim de prevenir a incidência de luz sobre o produto.

Nesse contexto, as antocianinas do resíduo agroindustrial de uva surgem como potencial fonte de corante natural para uso em alimentos, quando associado ao controle da luz e temperatura. No entanto, outros fatores como estrutura química, pH, ausência de oxigênio, acondicionamento, aplicação ao produto alimentício, influência de constituintes do alimento, como ácido ascórbico, íons metálicos, açúcares e copigmentos, etc. não foram investigados especificamente neste trabalho, o que sugere a realização de novos experimentos com vistas a viabilizar a utilização desses pigmentos, extraídos do resíduo agroindustrial de suco de uva cv. Isabel, como aditivo alimentar.

## CONCLUSÃO

O tempo de meia-vida das antocianinas do resíduo agroindustrial de suco de uva cv. Isabel foi reduzido quando estas foram expostas à luz e temperaturas elevadas. O teor desses pigmentos foi inversamente proporcional à intensidade do aquecimento, confirmando o efeito deletério do calor sobre a estabilidade das antocianinas. Assim, o menor tempo de meia vida das antocianinas submetidas ao calor confirma que o aquecimento é um fator muito mais drástico sobre a estabilidade das antocianinas do que a sua exposição à luz.

## REFERÊNCIAS

ARAMWIT, P.; BANG, N.; SRICHANA, T. The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits. **Food Research International**, v. 43, n. 4, p. 1093-1097, 2010.

BAKOWSKA-BARCZAK, A. Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants – a review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 14/55, n. 2, p. 107-116, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 28 out. 1997.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Manual de laboratório de química dos alimentos**. São Paulo: Varela, 2003. 135 p.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO; F. O. **Química do processamento de alimentos**. 2. Ed. São Paulo: Varela, 1992. 143 p.

BORDIGNON-LUIZ, M. T.; GAUCHE, C.; GRIS, E. F.; FALCÃO, L. D. Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 4, p. 594-599, 2007.

CLEMENTE, E.; GALLI, D. Stability of the anthocyanins extracted from residues of the wine industry. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 3, p. 765-768, 2011.

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

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

ES-SAFI, N.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Interactions between cyanidin 3-O-glucoside and furfural derivatives and their impact on food color changes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5586-5595, 2002.

ESPÍN, J. C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H. J.; GARCÍA-VIGUERA, C. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1588-1592, 2000.

FRANCIS, F. J. Food colorants: anthocyanins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 28, n. 4, p. 273-314, 1989.

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

HENRY, B. S. Natural food colours. In: HENDRY, G. A. F. **Natural food colorants**. New York: AVI, 1992. p. 39-78.

HURTADO, N. H.; PÉREZ, M. Identificación, estabilidad y actividad antioxidante de las antocianinas aisladas de la cáscara del fruto de capulí (*Prunus serotina spp capuli (Cav) Mc. Vaug Cav*). **Información Tecnológica**, v. 25, n. 4, p. 131-140, 2014.

JACKMAN, R. L.; SMITH, J. L. Anthocyanins and betalains. In: HENDRY, G. A. F. **Natural food colorants**. New York: AVI, 1992. p. 183-241.

KHANAL, R. C.; HOWARD, L. R.; PRIOR, R. L. Effect of heating on the stability of grape and blueberry pomace procyanidins and total anthocyanins. **Food Research International**, v. 43, n. 5, p. 1464-1469, 2010.

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

KOBYLEWSKI, S.; JACOBSON, M. F. **Food dyes: a rainbow of risks**. Center for Science in the Public Interest (CSPI), jun., 2010. Disponível em: <<http://cspinet.org/new/pdf/food-dyes-rainbow-of-risks.pdf>>. Acesso em: 11 nov. 2014.

LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the ph differential method: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 5, p. 1269-1278, 2005.

LEES, D. H.; FRANCIS, F. J. Standardization of pigment analysis in cranberries. **HortScience**, v. 7., n. 1, p. 83-84, 1972.

LI, J.; LI, X.; ZHANG, Y.; ZHENG, Z.; QU, Z.; LIU, M.; ZHU, S.; LIU, S.; WANG, M.; QU, L. Identification and thermal stability of purple-fleshed sweet potato anthocyanins in aqueous solutions with various pH values and fruit juices. **Food Chemistry**, v. 136, n. 3-4, p. 1429-1434, 2013.

LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; LIMA, D. E. S. Efeito da luz e da temperatura de congelamento sobre a estabilidade das antocianinas da pitanga roxa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 92-94, 2005.

LIMA, M. S.; SILANI, I. S. V.; TOALDO, I. M.; CORRÊA, L. C.; BIASOTO, A. C. T.; PEREIRA, G. E.; BORDIGNON-LUIZ, M.; 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.

MAIA, J. D. G.; PEREIRA, G. E.; MONTEIRO, F. P.; SOUZA, R. T.; LAZZAROTTO, J. J.; OLIVEIRA, J. B.; RITACHEL, P. Novas cultivares brasileiras de uvas para elaboração de suco no semiárido brasileiro: desempenho Agrônômico e qualidade do suco. **Circular Técnica**, n. 96. 1. ed. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2013. 24p. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/circular/cir096.pdf>>. Acesso em: 17 abr. 2014.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos (CEPPA)**, v. 24, n. 1, p. 59-82, 2006.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.

MAYAVEL, A.; GURUDEV SINGH, B.; DURAI, A.; MURUGEASAN, S. Evaluation of colour and stability of anthocyanin in red tamarind (*Tamarindus indica* L). **International Journal of Advanced Life Sciences**, v. 5, n. 2, p. 137-144, 2012.

MAZZA, G. Anthocyanins in grape and grape products. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, v. 35, p. 341-371, 1995.



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

MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K. B.; TIVERON, A. P.; MASSARIOLI, A. P.; OLDONI, T. L. C.; ZANUS, M. C.; PEREIRA, G. E.; ALENCAR, S. M. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p. 1088-1093, 2011.

MPOUNTOUKAS, P.; PANTAZAKI, A.; KOSTARELI, E.; CHRISTODOULOU, P.; KARELI, D.; POLILIOU, S.; MOURELATOS, C.; LAMBROPOULOU, V.; LIALIARIS, T. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2934-2944, 2010.

MOLDOVAN, B.; DAVID, L.; CHIȘBORA, C.; CIMPOIU, C. Degradation kinetics of anthocyanins from european Cranberrybush (*Viburnum opulus L.*) fruit extracts effects of temperature, pH and storage solvent. **Molecules**, 17, p. 11655-11666, 2012.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; DUNCAN, C. E.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1199-1205, 2009.

POLÔNIO, M. L. T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25, n. 8, p. 1653-1666, 2009.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; WROLSTAD, R. E. Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. In: WROLSTAD, R. E. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001. p. F1.1.1-F1.1.10.

SADILOVA, E.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. Thermal degradation of acylated and nonacylated anthocyanins. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 8, 2006.

SARI, P.; WIJAYA, C. H.; SAJUTHI, D.; SUPRATMAN, U. Colour properties, stability, and free radical scavenging activity of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit anthocyanins in a beverage model system: natural and copigmented anthocyanins. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1908-1914, 2012.

SILVA, G. J. F.; CONSTANT, P. B. L.; FIGUEIREDO, R. W.; MOURA, S. M. Formulação e estabilidade de corantes de antocianinas extraídas das cascas de jabuticaba (*Myrciaria* ssp.). **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 3, p. 429-436, 2010.

SUI, X.; ZHOE, W. Monte Carlo modelling of non-isothermal degradation of two cyanidin-based anthocyanins in aqueous system at high temperatures and its impact on antioxidant capacities. **Food Chemistry**, v. 148, p. 342-350, 2014.

STEFANI, G. P.; HIGA, M.; PASTORINO, A. C.; CASTRO, A. P. B. M.; FOMIN, A. B. F.; JACOB, C. M. A. Presença de corantes e lactose em medicamentos: avaliação de 181 produtos. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 32, n. 1, p. 18-26, 2009.

STRINGHETA; P. C.; BOBBIO, P. A. Copigmentação de antocianinas: uso de corantes naturais em alimentos processados. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 3, n. 14, p. 34-37, 2000.

VERBEYST, L.; CROMBRUGGEN, K. V.; PLANCKEN, I. V.; HENDRICKX, M.; LOEY, A. V. Anthocyanin degradation kinetics during thermal and high pressure treatments of raspberries. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 3, p. 513-521, 2011.

VERBEYST, L.; OEY, I.; PLANCKEN, I. V.; HENDRICKX, M.; LOEY, A. V. Kinetic study on the thermal and pressure degradation of anthocyanins in strawberries. **Food Chemistry**, v. 123, n. 2, p. 269-274, 2010.

WANG, B. C.; HE, R.; LI, Z. M. The stability and antioxidant activity of anthocyanins from blueberry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 1, p. 42-49, 2010.

## **5. CONCLUSÃO GERAL**

---

---

Os resultados permitem concluir que o resíduo agroindustrial de suco de uva cv. Isabel é uma fonte significativa para a obtenção de antocianinas, principalmente malvidina-3-O-glicosídeo, com considerável atividade antirradical, possivelmente relacionada à presença das antocianinas majoritárias identificadas e ao efeito sinérgico exercido por esses compostos, porém com estabilidade limitada à exposição à luz e temperatura elevada. Portanto, estas antocianinas apresentam-se como uma opção para o reaproveitamento de subprodutos vitícolas, sendo uma alternativa de uso para a indústria de alimentos, como corante natural que possui ação antioxidante, podendo ser utilizado em produtos alimentícios que apresentem um pH ácido, sejam acondicionados em embalagens opacas, e não sejam submetidos à tratamentos térmicos severos durante seu processamento. Assim, sugere-se a realização de novos estudos, como por exemplo, em sistemas modelos alimentares, a fim de avaliar as melhores condições para a sua aplicabilidade.